



## **Aquatische Ökotoxizität von Nanopartikeln – Versuche zur Aufklärung von Nanopartikeleffekten**

**Skjolding, Lars Michael; Sørensen, Sara Nørgaard; Hartmann, Nanna B.; Hjorth, Rune; Hansen, Steffen Foss; Baun, Anders**

*Published in:*  
Angewandte Chemie International Edition

*Link to article, DOI:*  
[10.1002/ange.201604964](https://doi.org/10.1002/ange.201604964)

*Publication date:*  
2016

*Document Version*  
Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link back to DTU Orbit](#)

*Citation (APA):*  
Skjolding, L. M., Sørensen, S. N., Hartmann, N. B., Hjorth, R., Hansen, S. F., & Baun, A. (2016). Aquatische Ökotoxizität von Nanopartikeln – Versuche zur Aufklärung von Nanopartikeleffekten. *Angewandte Chemie International Edition*, 128(49), 15448-15464. <https://doi.org/10.1002/ange.201604964>

---

### **General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

# Aquatische Ökotoxizität von Nanopartikeln – Versuche zur Aufklärung von Nanopartikeleffekten

Lars Michael Skjolding, Sara Nørgaard Sørensen, Nanna Bloch Hartmann, Rune Hjorth, Steffen Foss Hansen und Anders Baun\*

**Stichwörter:**

Nanopartikel · Toxikologie · Zelltoxizität



**D**ie Zahl von Produkten, die synthetische Nanopartikel (engineered nanoparticles, ENPs) enthalten, ist stark gestiegen, und damit wachsen auch die Bedenken im Hinblick auf mögliche ökotoxikologische Wirkungen von ENPs. Die Gewährleistung einer sicheren und nachhaltigen Nutzung von ENPs erfordert Umweltverträglichkeitsprüfungen und damit auch relevante und zuverlässige ökotoxikologische Daten. Während die Zahl an Publikationen über ökotoxikologische Effekte und die Aufnahme von ENPs schnell wächst, bleibt die Eignung von ENP-Daten für die Risikobewertung fraglich. Eine bedeutende Wissenslücke betrifft mögliche Nanopartikeleffekte, wenn Testorganismen ENPs in aquatischen Testsystemen ausgesetzt sind. Diese Lücke ist wegen der großen Bandbreite von ENP-Typen und ihres andersartigen Verhaltens gegenüber demjenigen gelöster Chemikalien in den Ökotoxizitäts-Testsystemen schwer zu füllen. Das Risiko falsch-negativer wie auch falsch-positiver Resultate ist hoch und meist schwer abzuschätzen. Dieser Aufsatz skizziert einige der Tücken von ENP-Toxizitätstests, die zu Fehlinterpretationen führen könnten. Des Weiteren schlägt er biologische Reaktionen vor, die es zu berücksichtigen gilt, um mögliche Effekte von Nanopartikeln in den aquatischen Testorganismen aufzuzeigen.

## 1. Einleitung

Im letzten Jahrzehnt ist die Zahl der Anwendungen von synthetischen Nanopartikeln beachtlich gestiegen, und damit einhergehend auch die Menge an Konsumgütern, die mutmaßlich synthetische Nanopartikel (engineered nanoparticles, ENPs) enthalten.<sup>[1,2]</sup> In einer aktuellen Studie wurde festgestellt, dass über 2300 Nano-Produkte für europäische Verbraucher erhältlich sind.<sup>[3]</sup> Derzeit sind öffentlich keine exakten Produktionsmengen von ENPs zugänglich. Gemäß einer Einschätzung auf Basis einer Unternehmensumfrage sind allerdings die meistproduzierten ENPs TiO<sub>2</sub> (550–5500 tJahr<sup>-1</sup>), SiO<sub>2</sub> (55–55 000 tJahr<sup>-1</sup>), AlO<sub>x</sub> (55–5000 tJahr<sup>-1</sup>), ZnO (55–550 tJahr<sup>-1</sup>), Kohlenstoffnanoröhren (CNTs; 55–550 tJahr<sup>-1</sup>), FeO<sub>x</sub> (5.5–5500 tJahr<sup>-1</sup>), CeO<sub>x</sub> und Ag (beide 5.5–550 tJahr<sup>-1</sup>).<sup>[4]</sup> Der Einsatz von ENPs in Anwendungen und Produkten resultiert in einer Freisetzung der Nanopartikel in die Umwelt,<sup>[5–8]</sup> weshalb die möglichen ökotoxikologischen Auswirkungen der ENPs untersucht werden müssen. Die erste Publikation, in der schädliche Effekte von ENPs (Fullerenen) auf Umweltorganismen beschrieben wurden, stammt aus dem Jahr 2004;<sup>[9]</sup> während sich erwies, dass die in dieser Studie beobachteten Effekte durch Lösungsmittelersetzung und nicht durch ENPs hervorgerufen worden waren,<sup>[10]</sup> fand man in anderen frühen Studien durchaus Effekte von ENPs auf eine Reihe von Organismen.<sup>[11–13]</sup> Seitdem hat sich der Bereich der Nanoökotoxikologie, mit mehr als insgesamt 750 publizierten Arbeiten von 2006 bis 2015,<sup>[14]</sup> gut etabliert. Die mögliche Umweltextposition gegenüber ENPs, zusammen mit ersten Hinweisen auf eine Ökotoxizität, führte zu einer Nachfrage nach Systemen und zuverlässigen Daten, die sich für eine Umweltrisikobe-

wertung eignen.<sup>[15,16]</sup> 2006 richtete die OECD die „Working Party on Manufactured Nanomaterials“ (OECD WPMN) ein, „...to ensure that the approaches for hazard, exposure and risk assessment for manufactured nanomaterials are of a high quality, science-based and internationally harmonized“. <sup>[17]</sup> Seit dieser Zeit hat sich die Menge an verfügbaren Informationen dank umfangreicher nationaler und internationaler Förderinitiativen rasch vergrößert.<sup>[18]</sup> Allerdings wurde schnell ersichtlich, dass das Wissen über natürlich auftretende Nanopartikel (1–100 nm) und Kolloide (1–1000 nm) nicht genügt, um ein detailliertes Modell für den Verbleib und das Verhalten von ENPs in der Umwelt zu entwickeln.<sup>[19]</sup> Ohne solche grundlegende Kenntnisse über Verbleib und Verhalten von ENPs wird die Risikoabschätzung enorm anspruchsvoll.<sup>[20]</sup> Außerdem sind die Wirkungsabschätzungen, die notwendig zum Vervollständigen der Risikobewertungen von ENPs sind, erschwert, da man noch nicht genug über die Ursachen von

## Aus dem Inhalt

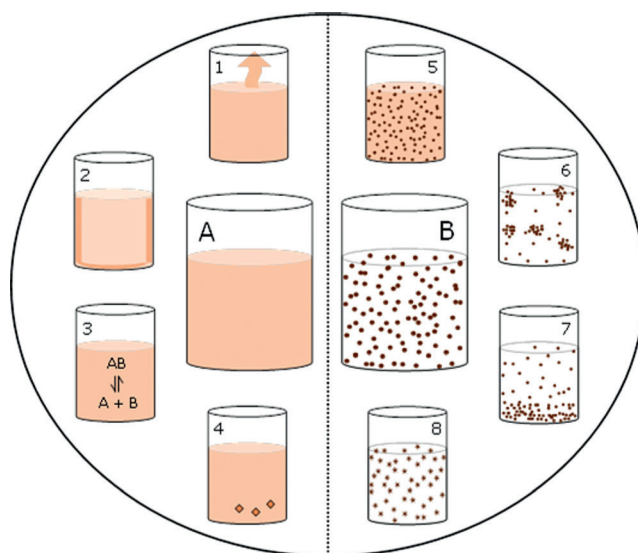
<b>1. Einleitung</b>	15449
<b>2. Physikalische Effekte von ENPs in Tests der aquatischen Toxizität</b>	15452
<b>3. Der Einfluss der gelösten Fraktion auf die aquatische Toxizität von ENPs</b>	15454
<b>4. Aufnahme, Internalisierung und Translokation synthetischer Nanopartikel in aquatischen Organismen</b>	15456
<b>5. Bekannte Mechanismen der ENP-Ökotoxizität – die Frage nach den Teilcheneigenschaften</b>	15458
<b>6. Auswirkungen des ENP-Verhaltens bei Richtlinientests zur Bewertung der Chemikaliensicherheit</b>	15459
<b>7. Abschließende Bemerkungen</b>	15461

[\*] Dr. L. M. Skjolding, Dr. S. N. Sørensen, Dr. N. B. Hartmann, M. Sc. R. Hjorth, Dr. S. F. Hansen, Dr. A. Baun  
Department of Environmental Engineering  
Technical University of Denmark  
Bygningstorvet B115, DK-2800, Kgs. Lyngby (Dänemark)  
E-Mail: abau@env.dtu.dk

© 2016 Die Autoren. Veröffentlicht von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution Non-Commercial License, die eine Nutzung, Verbreitung und Vervielfältigung in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert und nicht für kommerzielle Zwecke genutzt wird.

bei ENP-Tests beobachteten biologischen Reaktionen weiß. Die immense Vielfalt von ENPs in Bezug auf ihre chemische Identität, Partikelgröße und Oberflächenfunktionalisierung macht schwierig, die inhärenten Partikeleigenschaften, welche die Ökotoxizität von ENPs bestimmen, zu identifizieren und zu dokumentieren.<sup>[21,22]</sup> Der Mangel an gemeinsamen Deskriptoren wie auch der fundamentale Unterschied zwischen ENPs und löslichen Verbindungen geben Anlass zu ernsthafter Besorgnis über die Tauglichkeit herkömmlicher Testrichtlinien, wenn diese für ENPs angewendet werden, und daher auch über die Relevanz und Zuverlässigkeit der erhaltenen Resultate, wenn es um die Risikoabschätzung geht.<sup>[23]</sup> Anders als im Fall gelöster Chemikalien werden der Verbleib und das Verhalten von ENPs bei Ökotoxizitätstests ebenso wie in der Umwelt nicht durch Verteilungskoeffizienten bestimmt.<sup>[24,25]</sup>

Aus einem praktischen Blickwinkel in Bezug auf Ökotoxizitätstests besteht der Hauptunterschied zwischen ENPs und gelösten Chemikalien darin, dass ENPs eine feste Phase mit einer begrenzten physikalischen Form, ähnlich der von schwer löslichen Verbindungen, repräsentieren. Dementsprechend gibt es eine klare Grenze zwischen der festen und der flüssigen Phase bei ENPs in wässrigen Suspensionen, und das System wird deshalb mehr von physikalischen Kräften als von molekularen Transformationen beeinflusst.<sup>[27]</sup> Eine Reihe von Prozessen, die bei Tests mit gelösten Chemikalien oder ENPs in dynamischen Expositionskonzentrationen resultieren können, ist in Abbildung 1 dargestellt. Es ist jedoch zu betonen, dass ENPs in manchen Fällen als teilweise lösliche



**Abbildung 1.** Prozesse, die instabile Expositionskonzentrationen unter Exposition einer gelösten Verbindung (A) und suspensierter ENPs (B) verursachen können. Für gelöste Verbindungen umfassen diese Prozesse 1) Verdunstung, 2) Adsorption an Testgefäßen, 3) Spezierung, einschließlich Komplexbildung und Dissoziation, und 4) Präzipitation von ungelöster Chemikalie und/oder unlöslichen Reaktionsprodukten. Für suspendierte ENPs umfassen die Prozesse 5) Auflösung, 6) Agglomeration/Aggregation, 7) Sedimentation und 8) Oberflächenreaktionen und -reaktionen, einschließlich katalytischer Effekte, Redoxreaktionen und Änderungen von Beschichtungen/Stabilisatoren (adaptiert aus Lit. [26]).



Lars Michael Skjolding promovierte 2015 an der Technical University of Denmark im Department for Environmental Engineering bei Prof. Anders Baun mit einem Forschungsaufenthalt an der Universität Göteborg (Schweden) in der Gruppe von Dr. Joachim Sturve. Im Anschluss forschte er als Postdoktorand in der Gruppe von Prof. Anders Baun hauptsächlich über ökotoxikologische Effekte und die Umweltverträglichkeitsprüfung von Nanomaterialien, mit einem Schwerpunkt auf Bioakkumulation, Trophietransfer, Bildung und Charakterisierung synthetischer Nanopartikel in aquatischen Organismen.



Sara Nørgaard Sørensen ist Postdoktorandin im Department of Environmental Engineering der Technical University of Denmark bei Prof. Anders Baun, wo sie zur Umweltverträglichkeitsprüfung von Nanomaterialien forschet. Sie hat einen M. Sc. in Umweltingenieurwesen (2006) sowie einen Dokortitel für eine Arbeit über die Prüfung der aquatischen Ökotoxizität synthetischer Nanopartikel (2016) bei Prof. Anders Baun im Department for Environmental Engineering, Technical University of Denmark. Sie arbeitete zudem als Beraterin im Bereich der gesetzlichen Bestimmungen für die Umweltverträglichkeitsprüfung von Chemikalien beim Menschen, im Beruf und in der Umwelt (2006–2012).



Nanna B. Hartmann ist wissenschaftliche Assistentin auf dem Gebiet der ökotoxikologischen Effekte sowie der Verträglichkeitsprüfung von Nanomaterialien und Mikrokunststoffen an der Technical University of Denmark. Sie hat einen M. Sc. in Umweltingenieurwesen (Bauingenieurwesen, 2007) und einen Dokortitel für eine Arbeit über die Ökotoxikologie von Nanomaterialien (2011) bei Prof. Anders Baun im Department for Environmental Engineering, Technical University of Denmark. Zu ihren Forschungsgebieten zählen die Entwicklung von Testmethoden und Richtlinien für die Ökotoxikologieprüfung von Nanomaterialien sowie Nanomaterialien und Mikrokunststoffe als Träger für andere Chemikalien in der Umwelt.



Rune Hjorth promoviert derzeit in Nanoökotoxikologie und Verträglichkeitsprüfung bei Prof. Anders Baun im Department for Environmental Engineering, Technical University of Denmark. Dabei untersucht er Risiken und Nutzen der Verwendung von Nanopartikeln für die Umweltsanierung, alternative Prüfstrategien sowie die Verbesserung der Nanosicherheit durch frühe Entscheidungsfindung. Er trägt akademische Titel in Umweltingenieurwesen und Pharmazie.





C60 Daphnien [a]	TiO <sub>2</sub> Algen [b]	PEG-Au Fisch [c]	Ag-citrate Algen [d]	ZnO Daphnien [e]
---------------------	-------------------------------	---------------------	-------------------------	---------------------

**Abbildung 2.** Verschiedene mögliche Zustände von ENPs in einem aquatischen Medium, zusammen mit Beispielen von ENPs in verschiedenen standardisierten Testmedien für Ökotoxizitätstests. Von links nach rechts: Aggregation, Agglomeration, Einzelteilchen, teilweise aufgelöst und vollständig aufgelöst. Literaturverweise: [a] Baun et al.,<sup>[11]</sup> [b] Hartmann et al.,<sup>[59]</sup> [c] Skjolding et al.,<sup>[94]</sup> [d] Sørensen et al.,<sup>[74]</sup> [e] Cupi et al.<sup>[145]</sup>

Entitäten auftreten, die Ionen freisetzen (z.B. im Falle von teilweise löslichen metallischen ENPs wie Ag, ZnO und CuO), wie in Abbildung 2 illustriert ist. In den Kolloidwissenschaften ist eine kolloidale Dispersion traditionell definiert als kleine Partikel, die stabil in einer Flüssigkeit und undetektierbar unter normalen Lichtverhältnissen, jedoch ausreichend groß sind, um einen intensiven Lichtstrahl zu zerstreuen.<sup>[28,29]</sup> Wässrige kolloidale Dispersionen von ENPs können hergestellt werden, wenn man einen Stabilisator (z.B. Citrat) oder eine Partikelbeschichtung (z.B. Polyethylenglycol (PEG) oder Polyvinylpyrrolidon (PVP)) hinzufügt. Im Allgemeinen werden Ag- und Au-ENPs auf diese Weise vor der Ökotoxizitätsprüfung stabilisiert. Andere ENPs werden

durch Mahlen produziert, um trockene Pulver herzustellen (z.B. TiO<sub>2</sub>- und ZnO-ENPs), die anschließend einem Dispersionsverfahren unterzogen werden, um eine Suspension zu erhalten, die für Ökotoxizitätstests geeignet ist.<sup>[30]</sup> Die Gesamtstabilität suspendierter ENPs wird durch sowohl Partikel- als auch Medieneigenschaften bestimmt.<sup>[31,32]</sup> Deshalb werden die ENPs bei der Prüfung ihrer aquatischen Ökotoxizität in ihrem Zustand und Verhalten variieren (siehe Abbildung 2), was stark vom jeweiligen Testmedium abhängt.

Es sind bereits mehrere Übersichtsartikel veröffentlicht worden, die sich z.B. mit 1) der Realitätsnähe von Testbedingungen in Bezug auf die Umweltbedingungen,<sup>[33]</sup> 2) Modellierungsansätzen,<sup>[34]</sup> 3) den Auswirkungen von organischer Materie auf die Toxizität<sup>[35]</sup> sowie 3) ökotoxikologischen Effekten verschiedener ENPs<sup>[36–39]</sup> befassen, es fehlen jedoch offenbar noch immer Übersichten, welche die Auswirkungen von Nanopartikeln im Zusammenhang mit Versuchsaufbauten und beobachteten Effekten beurteilen. Handy et al.<sup>[40]</sup> und Petersen et al.<sup>[41]</sup> haben eine breite Palette von praktischen Überlegungen zusammengefasst, die für einen ökotoxikologischen Test mit ENPs wichtig sind. Allerdings sind diese Überlegungen sowie die Störfaktoren von ENPs in Versuchsaufbauten unseres Wissens noch nicht im Zusammenhang mit der Bewertung von Nanopartikeleffekten überprüft worden. Eine Isolierung der Nanopartikeleffekte, die durch die neuartigen intrinsischen Eigenschaften der ENPs als Folge von deren Größe verursacht werden, ist anhand der bisher veröffentlichten Arbeiten nicht möglich. In diesem Aufsatz werden die Implikationen der ENP-Eigenschaften und das mit ihnen zusammenhängende Verhalten in Testmedien vor, während und nach Ökotoxizitätstests überprüft, und zwar mit einem Fokus auf dem Basisdatensatz aquatischer Organismen (Fische, Krustentiere und Algen), die für die Klassifikation, Beschriftung und Konzentrations-Wirkungs-Bewertung genutzt werden, um den Nanopartikeleffekt bestimmen zu können. Für diese Organismen gibt es Standard-Toxizitätstests, und Daten sind verfügbar sowohl für diese Tests als auch für wissenschaftliche Studien, die nicht notwendigerweise diesen Richtlinien folgen.<sup>[14]</sup>

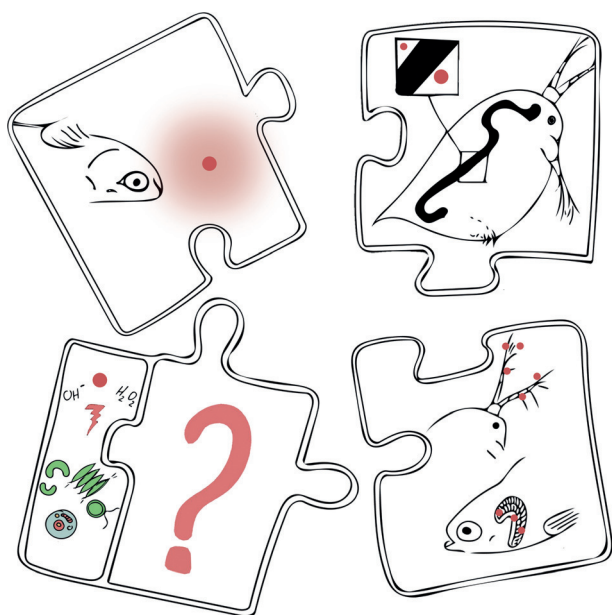
Das allgemeine Thema dieses Aufsatzes ist in Abbildung 3 wiedergegeben, in der drei Typen von biologischen Reaktionen illustriert werden, welche die aquatische Toxizität derart beeinflussen oder gar dominieren können, dass die Ermittlung von Nanopartikeleffekten schwierig wird. Hierbei sind Nanopartikeleffekte definiert als Effekte, die mit intrinsischen Eigenschaften der ENPs infolge einer Abnahme der Größe gegenüber derjenigen ihrer Volumenphase zusammenhängen. Die Reaktionstypen sind verbunden mit 1) physikalischer Bindung von ENPs an Testorganismen 2) Auflösung der ENPs in den aquatischen Medien, 3) diskreter Lokalisierung der ENPs innerhalb des Testorganismus. Des Weiteren empfehlen wir, dass bekannte Effektmechanismen von ENPs, beispielsweise die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), in Ökotoxizitätstest-Strategien Eingang finden sollten. Diese Effekte evaluieren wir in Relation zu Tests der aquatischen Ökotoxizität, um Befunde aufzudecken, bei denen die Toxizität über diejenige hinausgeht, die üblicherweise zu erwarten wäre (d.h. bei Exposition gegenüber einer nicht-nanopartikulären Chemikalie). Ent-



Steffen Foss Hansen ist Associate Professor für Regulatory Engineering an der Technical University of Denmark im Department of Environmental Engineering und NanoDTU. Er promovierte bei Prof. Anders Baun im Department for Environmental Engineering, Technical University of Denmark. Seine Forschung befasst sich 1) mit dem Einsatz von Wissenschaft und Ingenieurwesen in regulatorischen Szenarien, die von wissenschaftlicher Ungewissheit und Komplexität gekennzeichnet sind, und 2) mit der Risikoanalyse, Regulation und Steuerung von Nanotechnologien sowie der Anwendbarkeit von Werkzeugen zur Entscheidungsfindung unter ungewissen Bedingungen.



Anders Baun ist Professor für die Risikobewertung von Nanomaterialien und Leiter der Sektion für Umweltchemie im Department of Environmental Engineering der Technical University of Denmark. Er hat einen M. Sc. in Umweltingenieurwesen (DTU, 1994) und einen Dokortitel für eine Arbeit über Bio-tests zur Charakterisierung kontaminierter Wasserproben (DTU, 1998) bei Prof. Niels Nyholm im Department for Environmental Engineering, Technical University of Denmark. Im Rahmen seines Postdoktorats beschäftigte er sich mit der Risikobewertung sowie chemischen und biologischen Aspekten von Grundwasserverschmutzung. Sein Hauptforschungsgebiet ist die Umweltverträglichkeitsprüfung von Nanomaterialien.



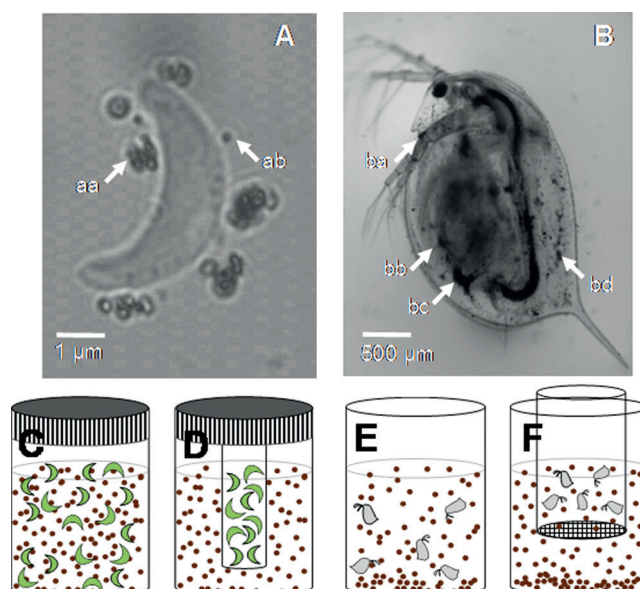
**Abbildung 3.** Drei Typen von biologischen Reaktionen, welche die aquatische Toxizität von ENPs beeinflussen und dominieren und Nanopartikeffekte in aquatischen Organismen maskieren könnten. Die Reaktionen stehen im Zusammenhang mit: Effekten, die von der gelösten Fraktion herrühren (oben links); Effekten, die mit der Internalisierung und Translokation von ENPs aufgrund deren geringer Größe verbunden sind (oben rechts); physikalischen Effekten der Nanopartikel (unten rechts); Nanopartikeffekten, die vermutlich mit der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zusammenhängen (unten links).

sprechende Wirkungen werden wir als Nanopartikeffekte bezeichnen.

## 2. Physikalische Effekte von ENPs in Tests der aquatischen Toxizität

Hier bewerten wir die Resultate von Ökotoxizitätstests mit dem Basissatz von Organismen für die Risikobewertung (Fische, Krustentiere und Algen) in Bezug auf physikalische ENP-Effekte. Physikalische Effekte sind in diesem Kontext definiert als mechanische Effekte, die nicht mit durch ENPs verursachten chemischen Reaktionen oder mit einer Auflösung der ENPs zu ionischen Spezies zusammenhängen. Abbildung 4 illustriert Testaufbauten, mit denen sich bestimmte physikalische Effekte bei Tests mit Algen und Daphnien identifizieren lassen (Abbildung 4 A,B).

Eine Überprüfung der erhältlichen Literatur zur Ökotoxizität von ENPs ergibt, dass Versuche, Nanopartikeffekte aufzudecken, oft in der Verwendung hoher Konzentrationen resultiert haben ( $> 10 \text{ mg L}^{-1}$ ).<sup>[14]</sup> Es wurde allerdings gezeigt, dass erhöhte Konzentrationen das Verhalten und damit das Schicksal der ENPs im Wasser verändern können.<sup>[44]</sup> Gleichmaßen können hohe ENP-Konzentrationen möglicherweise Effekte auslösen, die nicht infolge einer echten toxischen Reaktion entstehen, sondern eher durch eine Überbelastung des Testorganismus mit ENPs verursacht werden. Dies kann zu physikalischen Effekten wie Abschattungen in Al-



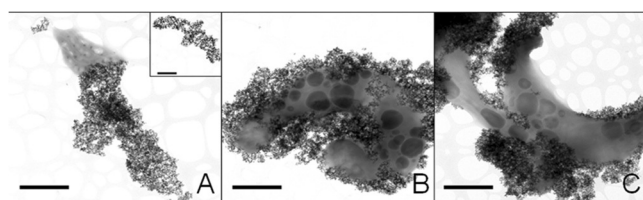
**Abbildung 4.** Oben: in wässriger Suspension  $\text{C}_{60}$  ausgesetzte Algen und Daphnien (adaptiert von Lit. [42]). Unten: Testaufbauten für die Untersuchung physikalischer Effekte (adaptiert aus Lit. [43]). A) Die Grünalge *Pseudokirchneriella subcapitata*, umgeben von  $\text{C}_{60}$ -Aggregaten  $> 1 \mu\text{m}$  (aa) und  $< 200 \text{ nm}$  (ab). B) Das Süßwasserkrustentier *Daphnia magna* nach 48 h Exposition gegenüber  $3 \text{ mg C}_{60} \text{ L}^{-1}$  in einer Bioakkumulationsstudie mit  $49 \mu\text{g L}^{-1}$  Phenanthren. Die schwarze Farbe des Verdauungstraktes zeigt die Aufnahme von  $\text{C}_{60}$ . Aggregate von  $\text{C}_{60}$  wurden auch auf der Antenne (ba), den Brustbeinen (bb), den Furca-Krallen (bc) und im Brutraum (bd) gefunden. Die Testaufbauten für Algen (C) und Daphnien (E), wo Prozesse wie Agglomeration, Aggregation, Sedimentation und Sorption an Prüfgläsern wie auch an Testorganismen die Testergebnisse beeinträchtigen und physikalische Effekte verursachen könnten. D) Physikalische Abschattungseffekte in Algentests können mithilfe eines Doppelgefäß-Testaufbaus studiert werden, bei dem sich die Algen in einem kleinen Innengefäß befinden und von der ENP-Suspension in einem größeren Außengefäß umgeben sind. F) Eine physikalische Immobilisierung der Daphnien infolge des Kontakts mit größeren aggregierten/sedimentierten ENPs kann verhindert werden, indem man die Daphnien in einem Becherglas mit Siebboden, eingefügt in ein größeres Becherglas mit ENP-Suspension, aufbewahrt (modifiziert nach Lit. [43]).

gentests,<sup>[26,45]</sup> verändertem Fressverhalten oder beeinträchtigter Mobilität bei Krustentieren<sup>[46,47]</sup> und erhöhter Schleimproduktion bei Fischen<sup>[48]</sup> führen. Dass die Anwendung hoher Konzentrationen nur eine begrenzte Aussagekraft für reale Umweltbedingungen bietet, wurde an anderer Stelle eingehend diskutiert;<sup>[34]</sup> folglich liegt der Fokus dieses Aufsatzes auf Tests der aquatischen Ökotoxizität im Rahmen der aktuellen Vorgehensweise für die Gefahrenidentifizierung sowie der Störfaktoren, die hieraus resultieren können.

Die Zahl der Partikel pro Volumeneinheit ist ausschlaggebend für die Möglichkeit von Kollisionen zwischen den ENPs und dem Organismus. Deshalb sollte man berücksichtigen, dass die Gesamtzahl der ENPs und ihre Gesamtoberfläche eine Funktion der abnehmenden ENP-Größe sind. Zum Beispiel ist bei der gleichen massenbasierten Konzentration die Oberfläche für 100-nm-ENPs etwa viermal so groß wie für 200-nm-ENPs. Grundsätzlich gibt es Kollisionswechselwirkungen mit jedem Partikeltyp infolge von Oberflä-

chenladungs-Wechselwirkungen und den Brownschen Mechanismen für Partikelkollisionen.<sup>[13]</sup> Auf der Makroskala wird eine Wechselwirkung zwischen einem größeren, beweglichen Organismus (größer als die ENPs) und ENPs überwiegend durch den Schergradienten, der mit der Bewegung des Organismus korreliert, beeinflusst. Die Kollisionshäufigkeit wird hauptsächlich von der Fortbewegungsgeschwindigkeit des Organismus abhängen, d. h., Organismen mit einem höheren Schwimmtempo erfahren mehr Kollisionen als solche mit einem niedrigeren Tempo.<sup>[47]</sup> Folglich wird das Ausmaß, in dem ENPs oder Agglomerate auf einen Organismus treffen, vom Schwimmtempo und der ENP-Konzentration abhängen (bei konstant gehaltener ENP-Größe). Ob die Kollision in einer Bindung zum Organismus resultiert, wird durch die wechselwirkenden Oberflächenladungen der Organismen und der ENPs festgelegt.<sup>[49]</sup> Dies bedeutet, dass die Zahl der ENP-Organismus-Wechselwirkungen bei einer erhöhten ENP-Konzentration zunehmen wird, unabhängig vom Mechanismus der toxischen Wirkung. Sowohl elektrostatische Anziehung als auch Rezeptor-Liganden-Wechselwirkungen sind mit einer Reihe von Algen und ENP-Typen beobachtet worden,<sup>[50–52]</sup> doch auch verschiedene funktionelle Gruppen können die Wechselwirkungen beeinflussen<sup>[53]</sup> und möglicherweise eine Adsorption auslösen.

Über physikalische Effekte ist oft bei Tests zur Inhibition des Algenwachstums mit ENPs berichtet worden. Es wurde vermutet, dass die Inhibition des Algenwachstums durch pH-Änderungen in der Umgebung der Alge sowie durch eingeschränkte Nährstoff- oder Lichtverfügbarkeit (Abschattung) aufgrund physikalischer Effekte verursacht sein könnte.<sup>[26,45,54,55]</sup> Mehrere Studien haben den Einfluss der ENP-Abschattung untersucht, indem Testaufbauten verwendet wurden, welche die Alge in der Weise von den ENP-Suspensionen separierten, dass das Licht die ENP-Suspension durchdringen musste, um die Alge zu erreichen (Abbildung 5). Solche Studien haben den Einfluss der Abschattung



**Abbildung 5.** Algenzellen mit einem hohen Grad an angehefteten  $\text{TiO}_2$ -ENPs nach A) 24 h, B) 48 h und C) 72 h Exposition gegenüber  $35 \text{ mg L}^{-1}$  (Maßstabsbalken:  $2 \mu\text{m}$ ; Wiedergabe aus Lit. [59] mit Genehmigung).

auf die Wachstumsinhibition sowohl bestätigt als auch widerlegt.<sup>[54–56]</sup> Auch wenn solche Tests hilfreich sind, um die Abschattung durch Dispersionstrübung zu untersuchen, werden sie doch keine lokalisierte Abschattung auf zellulärem Niveau infolge der Verkapselung der Zellen durch ENPs detektieren können, die deshalb nicht ausgeschlossen werden kann.<sup>[54]</sup> Eine beträchtliche Abschattung ist für relativ ungiftige Platin-ENPs, mit einem  $\text{EC}_{50}$ -Wert in der höheren Region des Klassifizierungsbereiches  $10\text{--}100 \text{ mg L}^{-1}$ , identi-

fiziert worden.<sup>[26]</sup> Hjorth et al. haben eine Methode zum Aufdecken solcher Effekte in Algentests vorgeschlagen,<sup>[57]</sup> bei der man relative Änderungen in Algenpigmenten nutzt; diese Vorgehensweise muss jedoch erst noch experimentell bestätigt werden. Beim derzeitigen Standard-Testschema werden physikalische Effekte als ein Störfaktor statt als Teil der intrinsischen Toxizität einer Chemikalie gesehen.<sup>[58]</sup>

Physikalische Auswirkungen auf den großen Wasserfloh (*Daphnia magna*) sind auch nach Exposition gegenüber relativ hohen Konzentrationen ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) von  $\text{CeO}_2$ -ENPs beobachtet worden, wobei sichtbare, an die Carapax sorbierte Aggregate entstanden.<sup>[60]</sup> Das Anhaften der  $\text{CeO}_2$ -ENP-Aggregate an die Carapax beeinflusste die Toxizität im Verlauf von 96 h nicht bedeutend. In einer 21-tägigen Untersuchung der chronischen Toxizität zeigte sich allerdings, dass  $10 \text{ mg L}^{-1}$   $\text{CeO}_2$ -ENPs zu einer Sterblichkeit von 100 % nach sieben Tagen Exposition führten, während  $3 \text{ mg L}^{-1}$   $\text{CeO}_2$ -ENPs in keiner Sterblichkeit binnen 21 Tagen resultierten. Es gab keine Zeichen von beeinträchtigter Ernährung nach Exposition gegenüber  $10 \text{ mg L}^{-1}$   $\text{CeO}_2$ -ENPs, wie anhand von Fettspeichertröpfchen beobachtet wurde, die sowohl den Darm als auch Algen im Verdauungstrakt umgaben (angedeutet durch einen grün gefärbten Verdauungstrakt). Dennoch war das Wachstum nach 96 h gehemmt, was auf einen erhöhten Energieverbrauch schließen lässt, beispielsweise für die Aufnahme und Ausscheidung von nicht nahrhaften  $\text{CeO}_2$ -ENPs, die Platz im Darm beanspruchen. Des Weiteren wurde nach einer Exposition gegenüber kleineren  $\text{CeO}_2$ -ENPs bei hohen Konzentrationen ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) eine geringere Häutung beobachtet als im Fall von  $\mu\text{m}$ -großen  $\text{CeO}_2$ -Partikeln.<sup>[60]</sup> Es ist darauf hinzuweisen, dass kein Auflösevorgang in diesem Experiment beobachtet wurde; dementsprechend sind diese Auswirkungen höchstwahrscheinlich mit einem physikalischen Effekt der ENPs verbunden, und zwar möglicherweise infolge einer Bindung oder eines erhöhten Energieverbrauchs für die Ausscheidung. Darüber hinaus ist *D. magna* imstande, ihre Filteraktivität abhängig von der Nahrungsverfügbarkeit zu regulieren,<sup>[61]</sup> und es wurde vorgeschlagen, dass eine Verwechslung von Partikeln (oder ENP-Agglomeraten) mit Nahrung zu einer Erhöhung der Filteraktivität führen könnte.<sup>[62]</sup> Demzufolge kann die Aufnahme von nicht nahrhaften ENP-Agglomeraten in Kombination mit einem höheren Energieverbrauch aufgrund erhöhter Filteraktivität manche der beobachteten Effekte erklären.

Eine verminderte Schwimmgeschwindigkeit zweier Daphnienarten (*D. similis* und *D. pulex*) ist auch nach Exposition gegenüber aggregierten  $\text{CeO}_2$ -ENPs ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) beobachtet worden.<sup>[46]</sup> Die Sprungfrequenz (die Frequenz, in der Daphnien mit ihren Antennen schlagen, um sich zu bewegen) war nicht beeinflusst, dementsprechend konnte die Daphnie nur kürzere Distanzen mit der gleichen Energieaufnahme bewältigen, da die verringerte Schwimmgeschwindigkeit indirekt den Energiestoffwechsel beeinflusste. Hingegen fanden Lovern et al. eine erhebliche Auswirkung auf die Sprungfrequenz nach Exposition gegenüber  $0.26 \text{ mg L}^{-1}$   $\text{C}_{60}$  und einem entsprechenden Fullenderivat ( $\text{C}_{60}\text{H}_x\text{C}_{70}\text{H}_x$ ).<sup>[63]</sup> Daphnien ernähren sich im Allgemeinen durch Filtrieren von Wasser und tendieren wegen des hohen Energieverbrauchs dieses Prozesses dazu, Umgebungen mit



hoher Algenkonzentration für maximale Ausbeute zu suchen. Folglich würde sich die Bewegungsenergie bei verringerter Schwimmggeschwindigkeit erhöhen und damit die Wachstumsenergie verringern, wie von Gaiser et al. beobachtet wurde,<sup>[60]</sup> und möglicherweise die Reproduktion und damit die Populationsdynamik beeinflussen. Des Weiteren ist die Schwimmggeschwindigkeit auch eng mit der Atmungsgeschwindigkeit verbunden. Während die Daphnie schwimmt, erzeugt sie einen Wasserstrom, und dieser ermöglicht den Austausch von Sauerstoff für die Atmung, aber auch für die Belüftung des Brutbeutels.<sup>[64, 65]</sup>

Das Binden von ENPs an die Außenseite wurde auch im Falle der TiO<sub>2</sub>-ENPs in einer Konzentration von 2 mg L<sup>-1</sup> beobachtet.<sup>[47]</sup> Im Laufe einer 96-stündigen Exposition haften sich die TiO<sub>2</sub>-ENP-Aggregate kontinuierlich an die Oberfläche von *D. magna* an. Die TiO<sub>2</sub>-ENP-Aggregate wurden nach der ersten Häutung komplett entfernt, bildeten sich aber innerhalb 1 h auf dem Exoskelett zurück und wuchsen kontinuierlich bis zum Ende des Experiments nach 96 h. In einem nachfolgenden Experiment zeigte sich, dass die erste Häutung ähnlich wie bei den Kontrollen innerhalb der 36 h Exposition auftrat, wohingegen die zweite Häutungsphase bei gegenüber 2 mg L<sup>-1</sup> TiO<sub>2</sub>-ENPs exponierter *D. magna* stark verspätet einsetzte. Ein niedrigerer Häutungserfolg von nur 10% wurde ebenfalls beobachtet, trotz einer abnehmenden Konzentration in der Wasserphase von 2 mg L<sup>-1</sup> auf 1.5 und 0.8 mg L<sup>-1</sup> nach 24 bzw. 72 h.<sup>[47]</sup> Im Verlauf der 96 h wurden die Daphnien nicht gefüttert, weshalb Nahrungsmittelmangel als Störfaktor berücksichtigt werden sollte. Trotzdem traten subletale Effekte auf, z. B. reduzierte Häutungen bei Konzentrationen < 1 mg L<sup>-1</sup>. Eine ähnliche Bindung von Ag-ENPs an den Panzer wurde bei Konzentrationen bis hinunter zu 0.01 mg L<sup>-1</sup> beobachtet, was auch die Schwimmfähigkeit beeinflusst.<sup>[66]</sup> Während die physikalischen Effekte für Algen und Krustentiere identifiziert wurden, gibt es weniger Berichte über die entsprechenden Effekte bei Fischen. In den frühen Lebensstadien wurde Adsorption von Ag-ENPs an das Chorion des Fischembryos auf ähnliche Art beobachtet wie bei der Adsorption an Algen und Krustentieren, die möglicherweise die Porenkanäle stört.<sup>[67]</sup> Bei ausgewachsenen Fischen hat sich gezeigt, dass ENPs leicht mit den Kiemenoberflächen wechselwirken und an ihnen haften.<sup>[68–71]</sup> In Studien wurden ein Anschwellen und eine erhöhte Schleimproduktion gefunden, was eine natürliche Antwort auf Kiemenreizungen ist.<sup>[48]</sup> Dies ist zwar nicht akut problematisch, jedoch könnten die chronischen Effekte stark sein.

Erhöhte Ventilationsraten wurden bei einer Studie an Fischen beobachtet, die einwandigen Kohlenstoffnanoröhren (SWCNTs) ausgesetzt waren, jedoch wurden die Mechanismen, die diesen Effekt verursachen, nicht dokumentiert.<sup>[48]</sup> Zudem trat aggressives Verhalten auf, das durch Atemstörungen verursacht sein könnte; ohne weitere Belege kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass diese Effekte durch Anhaften der ENPs an die Keime verursacht sein könnten. Während das Anhaften der ENPs mit Stress und möglicher Bewegungshemmung verbunden sein könnte und Prädation zu Veränderungen der Nahrungskettendynamik führen könnte, gibt es immer noch deutliche Wissenslücken,

was die Auswirkungen der ENP-Adhäsion und die hieraus folgenden Wechselwirkungen mit biologischen Oberflächen angeht.<sup>[72]</sup>

Offensichtlich verursachen ENPs subletale Effekte in Verbindung mit physikalischen Wechselwirkungen, nicht nur bei hohen (> 10 mg L<sup>-1</sup>), sondern auch bei niedrigen Konzentrationen (< 1 mg L<sup>-1</sup>). Die subletalen Effekte bei relativ niedrigen Konzentrationen finden sich am häufigsten bei Krustentieren und wurden auf Energiedefizite im Zusammenhang mit z. B. reduzierten Häutungen, Ernährungsmerkmalen und der Ausscheidung nicht nahrhafter Partikel im aufnehmbaren Nährstoff-Größenbereich der Krustentiere (z. B. *D. magna*) zurückgeführt. Deshalb müssen physikalische Effekte so gut wie möglich berücksichtigt oder eliminiert werden. Alternativ ist ein Wechsel des Testverfahrens notwendig, um zu bestätigen, dass ENPs auf andere Weise als lösliche Chemikalien physikalische Effekte verursachen oder zu den beobachteten biologischen Effekten beitragen.

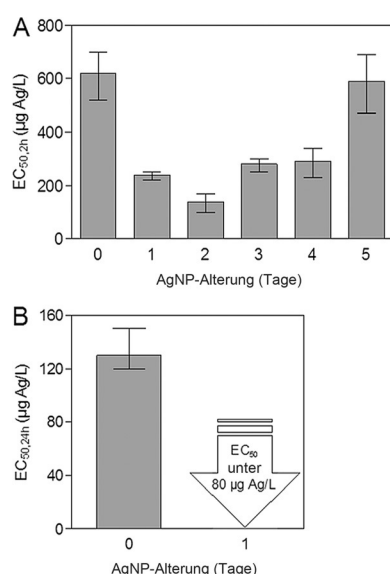
### 3. Der Einfluss der gelösten Fraktion auf die aquatische Toxizität von ENPs

Wasserlöslichkeit spielt eine zentrale Rolle für den Verbleib in der Umwelt, das Verhalten und die Effekte von Chemikalien, und in Richtlinien- und Standard-Ökotoxizitätstests erhalten schwer lösliche (organische und anorganische) Substanzen besondere Aufmerksamkeit wegen des Zusammenhangs zwischen Löslichkeit und resultierenden biologischen Effekten. Dieser Punkt wird durch spezifische Richtlinien und Anleitungen berücksichtigt.<sup>[58]</sup> Beim traditionellen Testmodell für „gängige“ Chemikalien gilt die gelöste Fraktion als verantwortlich für biologische Effekte. Daher findet sich in Anleitungen für Tests der aquatischen Ökotoxizität oft die Angabe, dass die untersuchten Konzentrationen nicht die maximale Wasserlöslichkeit der jeweiligen Verbindung überschreiten sollen, da dies zu fehlerhaften Resultaten führen würde, und dass die Anleitungen am einfachsten auf leicht lösliche Substanzen anwendbar sind. Somit besteht das Ziel ergänzender Anleitungen, wie des „OECD Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures“,<sup>[58]</sup> hauptsächlich darin, das Auflösen schwer löslicher Substanzen zu ermöglichen, um auf diese Weise Stammlösungen herzustellen, die für eine stabile Exposition genutzt werden können, z. B. durch Verwendung eines Lösungsmittels oder durch verlängertes Rühren, Beschallen und/oder Erhitzen, um den Auflösungsgrad zu erhöhen. Man hat jedoch gefunden, dass all diese Methoden die Ökotoxizität der ENPs beeinflussen und damit die Interpretation der erhaltenen Daten erschweren könnten.<sup>[22]</sup>

Auflösung wird relevant für die ENP-Ökotoxizität, wenn Ionen oder Moleküle von der ENP-Oberfläche in das umgebende Medium freigesetzt werden. ENPs können in unterschiedlichem Ausmaß löslich sein – von unlöslich bis schwer löslich, teilweise löslich oder komplett löslich –, abhängig vom ENP und den Testbedingungen (z. B. dem Testmedium), wie in Abbildung 2 veranschaulicht. Auflösungsvorgänge zu verstehen, ist von grundlegender Bedeutung für die Interpretation von Ökotoxizitätseffekten der ENPs. Die Auflösungs- und



netik (Auflösungsgeschwindigkeit) und das Löslichkeitsgleichgewicht (Menge des gelösten Materials) der ENPs beeinflussen deren biologische Effekte bei Ökotoxizitätstests. Ökotoxizitätseffekte können durch die partikuläre Form der ENPs und/oder das Auftreten gelöster Spezies dominiert werden,<sup>[73,41]</sup> was zur Toxizität durch verschiedene Wirkungsweisen beitragen könnte. Die Gesamteffekte werden daher aus den kombinierten Wirkungen des aufgelösten Materials und seiner Partikelform resultieren. Diese dynamische Beziehung der Toxizität wurde mithilfe eines zweistündigen Algen-<sup>14</sup>C-Assimilationstests mit *P. subcapitata* (Abbildung 6A) sowie eines 24-stündigen Tests der akuten Toxizität mit *D. magna* (Abbildung 6B) demonstriert; dabei erfolgte eine Exposition gegenüber Ag-ENPs, die 1–5 Tage gealtert waren, was in signifikant unterschiedlichen  $EC_{50}$ -Werten resultierte.<sup>[74]</sup>



**Abbildung 6.**  $EC_{50}$ -Werte als eine Funktion der Alterung von Ag-ENPs bei A) einem 2-stündigen Algen-<sup>14</sup>C-Assimilationstest und B) einem 24-stündigen Test der akuten Toxizität mit *D. magna* (Anmerkung: einen Tag gealterte Ag-ENPs resultierten in 100% Immobilität bei der niedrigsten Konzentration von  $80 \mu\text{g Ag L}^{-1}$ ). Die Säulen repräsentieren mittlere effektive Konzentrationen ( $EC_{50}$ -Werte), und die Fehlerbalken entsprechen 95% Konfidenzintervallen (adaptiert aus Lit. [75]).

Zwar gibt es eine generelle Tendenz eines höheren Lösungsgrads bei Verringerung des Partikeldurchmessers, jedoch ist das Verhältnis nicht komplex und schwer zu validieren.<sup>[73]</sup> Zum Beispiel kann das Vorhandensein einer Partikelbeschichtung die Löslichkeit beeinflussen und größenabhängige Veränderungen beim Lösen maskieren.<sup>[73]</sup> Für ZnO untersuchten Brian et al. die ENP-Größenabhängigkeit des Auflösungsgrads, indem sie drei verschiedene Partikelgrößen (4, 15, 241 nm) studierten.<sup>[76]</sup> Die Resultate verdeutlichen eine qualitative Tendenz zur generell verstärkten Auflösung kleinerer Partikel (4 und 15 nm gegenüber 241 nm). Wenn man jedoch die beiden kleinen Partikelgrößen vergleicht, lösten sich die 15-nm-ZnO-ENPs stärker auf als die 4-nm-Partikel, was auf eine Abweichung von der allge-

mein angenommenen, größenabhängigen Auflösung hindeutet. Mögliche Erklärungen sind eine erhöhte Aggregation der kleineren Partikel oder Unterschiede in der Oberflächenspannung, was eine quantitative Vorhersage der Auflösungseigenschaften auf Basis klassischer Thermodynamik erschwert.<sup>[76]</sup>

Die Tendenz, dass sich aggregierte ENPs weniger auflösen, könnte durch eine verringerte spezifische Oberfläche der Aggregate gegenüber der von Agglomeraten oder dispergierten ENPs erklärt werden, und in der Literatur finden sowohl Belege, die diese Theorie stützen, als auch solche, die ihr widersprechen. Einer Studie zufolge wird die Auflösung von Ag-ENPs durch die ursprüngliche Ag-ENP-Größe kontrolliert und nicht durch nachfolgende Aggregation.<sup>[77]</sup> Im Gegenzug verläuft nach einer anderen Studie die Auflösung von Ag-ENPs langsamer bei einer höheren Ionenstärke, wo eine stärkere Aggregation beobachtet wurde, als in Medien mit niedrigerer Ionenstärke.<sup>[78]</sup> Diese Befunde stützt ein Vorschlag, dem zufolge ein scheinbar formabhängiger Unterschied bei der Auflösung von kugel- und stabförmigen CuO-ENPs in Wirklichkeit ein indirektes Resultat von formabhängigen Unterschieden bei der Aggregation sein könnte.<sup>[79]</sup> Des Weiteren wurde beobachtet, dass die ENP-Konzentration die Auflösungskinetik und das Löslichkeitsgleichgewicht beeinflusst, was von Baek und An<sup>[80]</sup> für Cu-ENPs gezeigt wurde, wo die Auflösungsgeschwindigkeit mit erhöhter ENP-Konzentration abnahm. Die Konzentration könnte in diesem Fall durch eine konzentrationsabhängige Zunahme der Aggregation indirekt die Auflösung beeinflussen. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Rolle der Aggregation bei der ENP-Auflösung zu klären.

Während bis jetzt nicht gut verstanden ist, welche physikalischen und chemischen Parameter der ENPs und der Testmedien die Auflösung steuern, ist allgemein anerkannt, dass sich Ag-, ZnO- und CuP-ENPs in gewissem Maße lösen, nachdem sie zu einem Testmedium zugegeben wurden. Des Weiteren kann als gesichert gelten, dass die Toxizität dieser ENPs teilweise – und in manchen Fällen vollständig – durch die aufgelösten Metallionen und -komplexe verursacht wird. Zum Beispiel setzen Ag-ENPs bekanntermaßen  $\text{Ag}^+$ -Ionen in der Gegenwart von Wasser und Sauerstoff frei,<sup>[81]</sup> und es sind positive Korrelationen zwischen der Auflösungsgeschwindigkeit von Ag-ENPs und der Toxizität gegenüber z. B. *D. magna* gefunden worden.<sup>[82,83]</sup> In einem Übersichtsartikel wurde eine ähnliche Tendenz für ZnO-ENPs betont, was darauf schließen lässt, dass die gelöste Fraktion die beobachtete Toxizität ausgelöst hat.<sup>[84]</sup> Allerdings ließ sich in manchen Fällen die Toxizität von CuO- und Ag-ENPs nicht vollständig durch die Toxizität der gelösten Fraktionen erklären. Zum Beispiel unterschied sich das Expressionsprofil von Ag-ENPs von dem einer gelösten Kontrolle ( $\text{AgNO}_3$ ) in *D. magna*, wo Ag-ENPs den Proteinstoffwechsel und die Signalübertragung beeinflussen, während  $\text{AgNO}_3$  Auswirkungen auf Entwicklungsprozesse hat.<sup>[85]</sup> Bei einem ähnlichen Fall unterschied sich das Genexpressionsmuster im Zebrafisch nach Ag-ENP-Exposition von demjenigen nach Ionenexposition.<sup>[86]</sup> Die Mechanismen, die diese Unterschiede in der Toxizität steuern, sind jedoch kaum verstanden. Nichtsdestoweniger wird empfohlen, dass bereits etablierte

Modelle für die Speziesverteilung von Spurenmetallen, z. B. das Freie-Ionen-Aktivitäts-Modell,<sup>[87]</sup> das Modell biotischer Liganden,<sup>[88]</sup> vorhandene Modelle für die Bioakkumulation, z. B. das biodynamische Modell<sup>[89]</sup> sowie das chemo- und biodynamische Modell,<sup>[90]</sup> genutzt werden, um den Effekt der gelösten Fraktion zu berücksichtigen und somit die Interpretation eines möglichen Nanopartikeleffekts zu erlauben.

Ökotoxizitätstests von ENPs, die sich auflösen könnten, müssen die komplexen Beziehungen zwischen ENP-Eigenschaften und Medienzusammensetzung berücksichtigen und zudem einen starken Fokus auf die Auflösungskinetik sowie das Nicht-Gleichgewichts-Verhalten der ENP-Auflösung während der Toxizitätstests legen. Dies wird in den meisten Fällen zusätzliche (fortgeschrittene) chemische Analysen und etwas Methodenentwicklung erfordern, um zu gewährleisten, dass die Resultate das tatsächliche In-situ-Auflösungsverhalten unter den Testbedingungen widerspiegeln.

#### 4. Aufnahme, Internalisierung und Translokation synthetischer Nanopartikel in aquatischen Organismen

Stone et al.<sup>[22]</sup> stellten in einem umfassenden Übersichtsartikel fest: „only few studies have dealt with bioaccumulation of metal ENPs“. 2013 überprüften Hou et al.<sup>[91]</sup> 65 Publikationen über die biologische Akkumulation von ENPs in Wasser, Erde oder Sedimenten. Sie fanden, dass Krustentiere ( $n = 21$ ) und Fische ( $n = 27$ ) die meistgetesteten Organismen waren, und es wurden lineare Beziehungen zwischen der Konzentration in der Wasserphase und derjenigen im Organismus aufgedeckt. Jedoch ignoriert diese Methode die zugrundeliegenden Mechanismen, welche diese lineare Angleichung erklären würden. In der ausgewerteten Literatur überschreitet die ENP-Aufnahme bei der Daphnie generell diejenige bei Fischen um einen Faktor von ca. 100. Jedoch sollten diese Zahlen mit Vorsicht behandelt werden, da in vielen der Studien die beobachtete Körperlast hauptsächlich darauf zurückgeführt wurde, dass die ENPs im Darm verblieben und somit nicht in den Organismus verlagert wurden. Des Weiteren ist anzumerken, dass die ENPs durch Aggregation in einen Größenbereich für eine aktive Filtration überführt werden können, z. B. bei *D. magna*, das Partikel mit einer Größe von 0.4 bis 40  $\mu\text{m}$  zurückhält.<sup>[92,93]</sup>

Eine neuere Literaturübersicht (2013–2015) wurde von Skjolding zusammengestellt,<sup>[94]</sup> sie erbringt 88 relevante wissenschaftliche Dokumente – von aquatischen (48 Dokumente) über Sediment- (12 Dokumente) bis hin zu terrestrischen Organismen (28 Dokumente) –, wobei die häufigsten aquatischen Spezies Daphnien (17 Dokumente) und Fische (14 Dokumente) in den Gruppen der Wirbellosen und Protozoen bzw. der aquatischen Wirbeltiere sind. Es wurde gezeigt, dass ENPs in Organismen auf verschiedenen trophischen Niveaus, von einzelligen Algen bis hin zu Fischen, eindringen, jedoch ist noch immer unklar, ob ENPs in Zellen und Gewebe internalisiert werden und in welchem Umfang sie in den Organismus verlagert werden. Des Weiteren muss noch im Detail untersucht werden, ob die Gegenwart von ENPs in Organen aquatischer Organismen biologische Ef-

fekte hervorruft. Während über die Internalisierung verschiedener ENPs in vitro häufig berichtet worden ist,<sup>[95]</sup> sind die Publikationen über Internalisierungsmechanismen und Belege hierfür in vivo weniger umfangreich.

Der Basissatz für Ökotoxizitätstests (Algen, Daphnien und Fische) enthält Algen als Repräsentanten für Primärproduzenten. Bei Mikroalgen stellen die relativ dicken und harten Zellwände eine Barriere dar, die, wie gemeinhin angenommen wird, eine ENP-Internalisierung verhindert. Jedoch haben Zellwände Poren mit Durchmessern von 5 bis 20 nm, deren Durchlässigkeit im Laufe des Zellzyklus beeinträchtigt wird.<sup>[96]</sup> Des Weiteren könnte eine Internalisierung auch durch z. B. Zellwand- oder Membranschädigungen im Zusammenhang mit gelösten Metallspezies oder der Bildung von ROS induziert werden, wie nachstehend diskutiert wird. Experimentelle Belege für eine Internalisierung von Ag-, CuO- und TiO<sub>2</sub>-ENPs sind für verschiedene Algenarten durch mehrere Techniken erbracht worden, obwohl die Aufnahmemechanismen und -wege nicht geklärt sind.<sup>[96]</sup> Eine Studie über die Internalisierung von AgNPs in Algen identifizierte AgNPs innerhalb von Zellen unabhängig von der Exposition gegenüber AgNPs oder Silberionen. Somit könnten AgNPs vielleicht nicht nur als Partikel internalisiert werden, sondern sich auch innerhalb der Zelle aus assimilierten Silberionen bilden,<sup>[97]</sup> was die Identifizierung der Aufnahmemechanismen erschwert. Ähnliche Effekte in Bezug auf die Bildung oder Internalisierung von ENPs werden häufiger bei Pflanzen beobachtet (siehe hierzu die Übersicht von Schwab et al.<sup>[98]</sup>).

Derzeit ist das Wissen über die Auswirkungen einer Internalisierung von ENPs in Algen begrenzt. Eine Studie deutete darauf hin, dass die Toxizität von CuO-ENPs die Folge einer Internalisierung und intrazellulärer Wechselwirkungen ist und dass der Hauptmechanismus in der intrazellulären ROS-Bildung besteht.<sup>[99]</sup> Diese Schlussfolgerungen beruhten auf gemessenen Körperlasten in gewaschenen Algenzellen, intrazellulärer ROS-Bildung und Inhibierung der Photosystem-II(PSII)-Aktivität der Alge *C. reinhardtii* bei Exposition gegenüber beschichteten und unbeschichteten CuO-ENPs und deren gelösten Fraktionen. Die Aufnahme in Gegenwart von CuO-ENPs war höher als bei alleiniger Exposition gegenüber gelösten Fraktionen, und es wurde eine höhere Körperlast und Toxizität bei den beschichteten CuO-ENPs als bei den unbeschichteten gefunden. In ähnlicher Weise wurde die Internalisierung von Ag-ENPs in die mixotrophe Alge *Ochromonas danica* als ein biologischer Weg für die Algentoxizität vorgeschlagen. Dies stützte sich auf intrazelluläre Ag-ENPs, die durch Elektronenmikroskopie identifiziert wurden, und die Toxizität trat sogar dann auf, wenn freie Ag<sup>+</sup>-Ionen durch das Versetzen mit Glutathion aus dem Medium entfernt wurden.

Bewegt man sich die trophische Kette aufwärts zu den Krustentieren und Fischen, wird der Aspekt der Internalisierung und Translokation immer deutlicher ausgeprägt. Während Ernährungsmerkmale von z. B. *D. magna* die Aufnahme von agglomerierten oder aggregierten ENPs wie in Abschnitt 2 beschrieben begünstigen könnten, ist ebenfalls eine Aufnahme von primären ENPs durch die Aufnahme von Wasser für die Verdauung im Fall von Daphnien<sup>[101]</sup> oder

durch das Trinken von Wasser im Fall von Fischen möglich.<sup>[102]</sup> Während sich viele Studien auf die aquatische Exposition konzentriert haben,<sup>[14,94]</sup> ist klar, dass die Exposition bei der Nahrungsaufnahme aufgrund des physikalischen Anhaftens der ENPs an Nahrungsquellen den Zugang von ENPs beispielsweise zum Darm ermöglichen würde.<sup>[103]</sup>

Verschiedene Methoden sind verwendet worden, um die mögliche Internalisierung von ENPs und die damit verbundenen Effekte in z.B. Daphnien aufzuklären. Mit transmissionselektronenmikroskopischen (TEM-)Studien wurde das Vorhandensein von ENPs im Darm von *D. magna* nachgewiesen.<sup>[104–106]</sup> Konfokale Mikroskopie ganzer Organismen lieferte Hinweise auf die Translokation von z.B. Polystyrol-ENPs<sup>[107]</sup> und -Quantenpunkten.<sup>[108]</sup> Auch ist Dunkelfeld-Lichtmikroskopie dafür angewendet worden, die Aufnahme von Ag-Stäbchen in *D. magna* zu zeigen.<sup>[109]</sup> Für das Studium der zellulären Wechselwirkungen im Zusammenhang mit der Internalisierung und Translokation von ENPs ist die TEM eine häufig verwendete Methode. Untersuchungen haben allerdings gezeigt, dass eine gründliche Elementaranalyse notwendig ist, um die Fehlinterpretation hochdichter Einheiten zu verhindern, die irrtümlich als ENPs aufgefasst werden könnten.<sup>[110–112]</sup> Obgleich theoretisch möglich, ist die Aufnahme von ENPs in Epithel-Darmzellen bis jetzt noch nicht in vivo beobachtet worden, z.B. für *D. magna* (SWCNTs: Lit. [111], Au-ENPs: Lit. [104,113,114], TiO<sub>2</sub>-ENPs: Lit. [115]). In anderen Studien wurde dagegen eine Passage durch die Mikrovilli beobachtet (ZnO-ENPs: Lit. [116], CuO-ENPs: Lit. [105], Quantenpunkte: Lit. [108]). Allerdings sind diese Studien selten mit einer ionischen Kontrolle oder mit einer Volumenversion der gleichen Materialien wie die ENPs durchgeführt worden; dies verhindert jegliche sichere Aussage über den Einfluss der nm-großen Partikel. Bei Fischen wurde die höchste Konzentration von ENPs ebenfalls im Darm gefunden,<sup>[117–121]</sup> während erhöhte Konzentrationen verschiedener ENPs auch in beispielsweise Kiemen, Leber und Gehirn festgestellt wurden.<sup>[119–121]</sup> Dies zeigt ein Potenzial für die Translokation, auch wenn die Konzentrationen niedriger als jene im Darm sind. Eine systematische Studie von Osborne et al.<sup>[122]</sup> über das intestinale Gewebe von Zebrabärblingen kann als ein Beispiel für größenabhängige Unterschiede bei der Translokation von ENPs (20-nm- und 110-nm-Ag-ENPs) im Vergleich mit einer ionischen Kontrolle gesehen werden. Die 20-nm-Ag-ENPs erhielten Zugang zur basolateralen Membran, während sowohl die 110-nm-Ag-ENPs als auch die Ionen auf die apikale Membran beschränkt blieben.<sup>[122]</sup> Unterschiede wurden auch in Kiemzellen beobachtet, wo Ag-ENPs hauptsächlich an den Sekundärfasern lokalisiert waren, während Ag hauptsächlich in den Primärfäden der gegenüber der ionischen Kontrolle exponierten Zebrabärblinge vorhanden war.<sup>[122]</sup> Dies verdeutlicht die Notwendigkeit, Unterschiede bei der Internalisierung und Translokation je nach der ENP-Größe, aber auch im Vergleich mit einer gelösten Kontrolle, zu berücksichtigen. Die Mechanismen, die den Unterschieden bei der Internalisierung und Translokation zugrunde liegen, sind jedoch noch nicht gut verstanden.

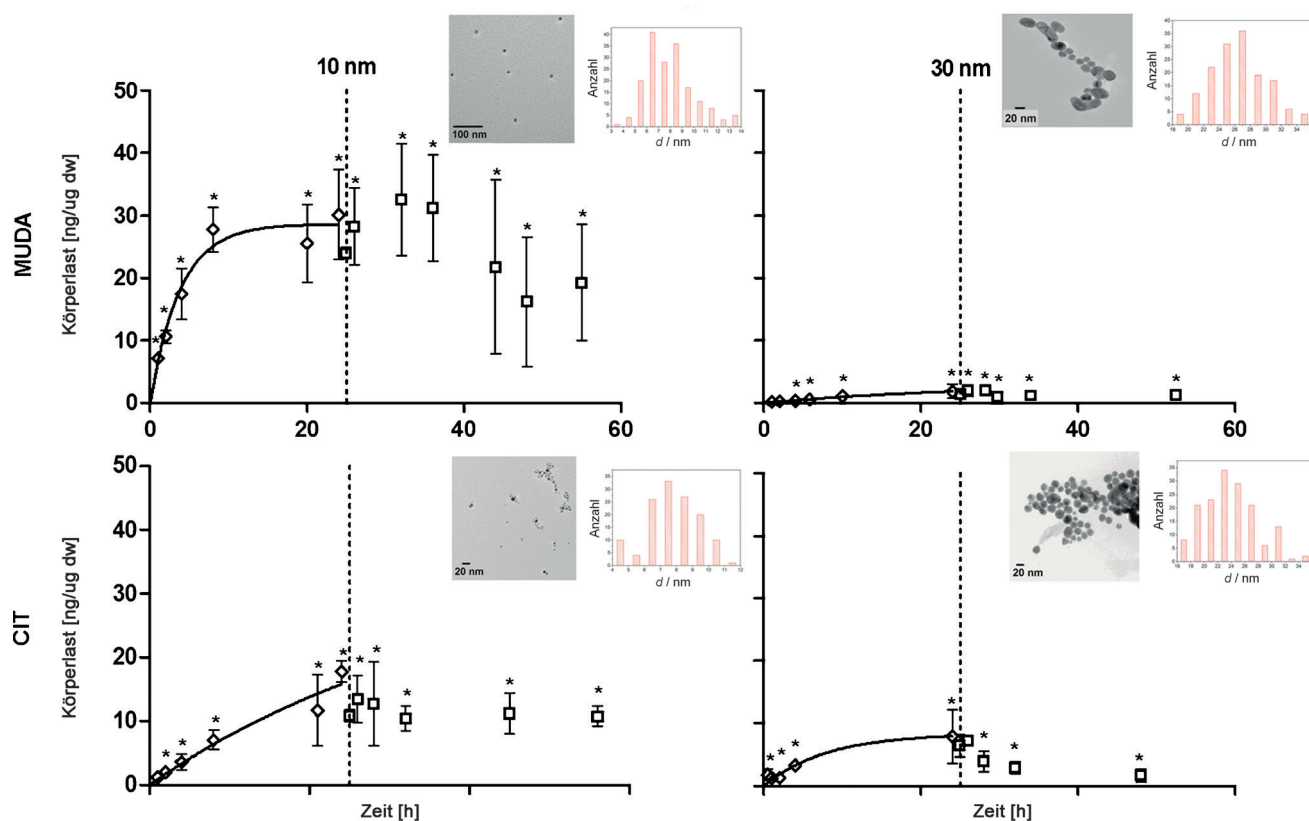
Es sollte auch erwähnt werden, dass Effekte möglicherweise auch ohne eine Internalisierung oder Translokation der

ENPs im Organismus auftreten könnten, und zwar allein aufgrund der Gegenwart der ENPs im Darm. Bei Fischen ist bei einer Exposition gegenüber TiO<sub>2</sub>-ENPs eine Hervorwölbung von Darmhautschichten beobachtet worden, ohne Zeichen einer Internalisierung.<sup>[115]</sup> Eine Reduktion der Nahrungsaufnahme und Energieeinträge, eine Veränderung der Darmmobilität sowie Auswirkungen auf Nerven oder glatte Muskelfasern sind ebenfalls als Effekte vorgeschlagen worden, die nicht notwendigerweise mit einer Internalisierung der ENPs verbunden sind.<sup>[123]</sup> In der Tat haben Mattsson et al. Auswirkungen auf das Fress- und Schwarmverhalten nach Langzeitexposition gegenüber Polystyrol-ENPs über einen Nahrungsaufnahmeweg beobachtet.<sup>[103]</sup> Auch wurden Auswirkungen auf das Rheotaxis-Verhalten nach Exposition gegenüber Cu- und Ag-ENPs festgestellt,<sup>[124]</sup> vielleicht ein Hinweis auf eine Interferenz mit Verhaltenssystemen mit möglichem Bezug zur Translokation ins Gehirn.<sup>[103]</sup> Allerdings ist diese Art von Effekten derzeit trotz systematischer Studien nicht gut verstanden.

Häufig wurde von einer schnellen anfänglichen ENP-Ausscheidung berichtet, wenn die Testorganismen in saubere Medien überführt wurden, z.B. bei Daphnien (Abbildung 7).<sup>[104,114,125]</sup> Allerdings ist eine unvollständige Ausscheidung von ENPs in mehreren Studien mit Fischen<sup>[71,119,127,128]</sup> (Abbildung 8) und Daphnien<sup>[113,114,126]</sup> (Abbildung 7) dokumentiert worden. Wechselwirkungen zwischen den ENPs und Darmepithel-Sorptionsvorgängen könnten eine zentrale Rolle bei dieser unvollständigen Ausscheidung spielen. Zurückgehaltene ENPs könnten indirekt eine verlängerte Exposition gegenüber den ENPs bewirken. Zum Beispiel sind erhöhte Effekte für CuO-ENPs gegenüber einer gelösten Kontrolle bei einer 1–3-stündigen, pulsformigen Exposition von Daphnien gegenüber CuO-ENPs (0.2–3.2 mg Cu L<sup>-1</sup>) mit einer nachfolgenden Post-Expositionsperiode in reinem Medium beobachtet worden, bei der akute und chronische Effekte nach 48 h und 21 Tagen untersucht wurden.<sup>[129]</sup> Die Immobilisierung, die 48 h nach dem Puls registriert wurde, war mit derjenigen bei einer 24-stündigen, fortgesetzten Exposition vergleichbar. Über 21 Tage wurde dagegen beobachtet, dass die 1–3-stündigen Pulse von CuO-ENPs sowohl die Zeit bis zum ersten Nachwuchs als auch die Produktion des Nachwuchses beeinflussen. Wurden die Expositionskonzentrationen von CuO-ENPs auf die gemessene gelöste Cu-Fraktion bezogen, war die Abnahme bei der Nachwuchsproduktion stärker für CuO-ENPs als für CuCl<sub>2</sub>. Dies könnte darauf schließen lassen, dass Effekte im Zusammenhang mit unvollständiger Ausscheidung zu einer längeren internen Exposition gegenüber CuO-ENPs als gegenüber CuCl<sub>2</sub> führen.

Die obigen Ausführungen machen deutlich, dass die Aufnahme, Internalisierung und Translokation beim Testorganismen-Basisatz möglicherweise in unterschiedlichem Umfang auftreten; die häufigsten Effekte wurden bei den höheren trophischen Niveaus der Daphnien und Fische beobachtet. Erwähnenswert ist auch, dass es derzeit keine konsistenten und validierten Testrichtlinien unter Berücksichtigung von Verhaltenswirkungen oder dem Vorhandensein von ENPs z.B. im Darm gibt. Dementsprechend könnten





**Abbildung 7.** Aufnahme- und Ausscheidungsstudie mit *D. magna*, exponiert gegenüber  $0.5 \text{ mg Au L}^{-1}$  für 24 h Aufnahme ( $\diamond$ ) und 24 h Ausscheidung ( $\square$ ) nach Überführung der Tiere in ein reines Medium. Zwei Partikelgrößen (10 und 30 nm) und Stabilisierungsmittel (MUDA: Mercapto-undecansäure, CIT: Citrat) wurden angewendet. Die markierten Punkte (\*) sind statistisch signifikant anders als die der Kontrolle ( $p < 0.05$ ). Einschübe: TEM-Bilder und Anzahl-Durchmesser-Histogramme von Au-ENPs in MilliQ-Wasser von oben links: MUDA-10-nm-Au-ENPs ( $d = (8.0 \pm 3) \text{ nm}$ ), MUDA-30-nm-Au-ENPs ( $d = (27.0 \pm 6) \text{ nm}$ ), CIT-10-nm-Au-ENPs ( $d = (7.5 \pm 3) \text{ nm}$ ) und CIT-30-nm-Au-ENPs ( $d = (23.0 \pm 9) \text{ nm}$ ). Modifiziert aus Lit. [114].

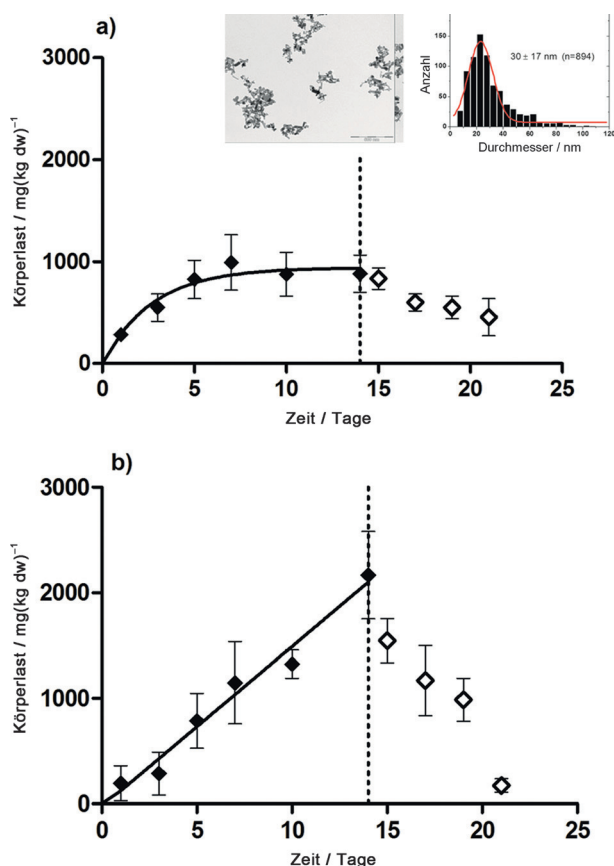
Effekte im Zusammenhang mit der Exposition von ENPs bei Tests der akuten Toxizität möglicherweise übersehen werden.

### 5. Bekannte Mechanismen der ENP-Ökotoxizität – die Frage nach den Teilcheneigenschaften

Aus den vorigen Abschnitten wird deutlich, dass man für die Ermittlung von Nanopartikeleffekten bereits bekannte Effekte (gelöste Fraktionen, physikalische Effekte usw.) berücksichtigen muss. Des Weiteren sollten Teilcheneigenschaften, die bereits für das Auslösen bestimmter Effekte bekannt sind, untersucht werden, bevor man neuartige Nanopartikeleffekte postuliert oder ausschließt. Das Potenzial einer Umweltgefährdung durch ENPs ist im letzten Jahrzehnt intensiv überprüft worden, um solche Kausalitäten zwischen Partikeleigenschaften und toxischen Reaktionen aufzuklären. In der Humantoxikologie gibt es die Hypothese, dass oxidativer Stress und die Produktion von Sauerstoffradikalen (ROS) direkt mit der vergrößerten Gesamtoberfläche der ENPs verbunden sind und dass die ROS-Bildung als charakteristischer Wirkungsmodus von ENPs angesehen werden sollte.<sup>[130,131]</sup> Für die Nanoökotoxikologie haben Klaine et al.<sup>[132]</sup> in ähnlicher Weise geschlussfolgert, dass die Fähig-

keit zur ROS-Bildung indirekt die Triebkraft für eine Reihe beobachteter zellulärer Reaktionen auf ENPs war, darunter Membran- und Nukleinsäureschäden, Proteinstabilisierung und Lipidperoxidation; diese werden kollektiv als oxidativer Stress bezeichnet, der zu Gen- und Zytotoxizität führen kann.<sup>[133,134]</sup>

In den letzten Jahren wurde in mehreren Übersichtsartikeln hervorgehoben, dass oxidativer Stress infolge von ROS-Bildung die Hauptwirkung von ENPs auf aquatische Organismen ist, wenn die Effekte nicht mit einer Auflösung oder physikalischen Wechselwirkungen in Zusammenhang gebracht werden können.<sup>[14,135,136]</sup> Allerdings ist die Verknüpfung zwischen Teilcheneigenschaften und ROS-Bildung in der Ökotoxikologie unklar; auch die Frage, ob die Größe tatsächlich mit der Toxizität korreliert, wird kontrovers diskutiert;<sup>[134]</sup> von Moos und Slaveykova<sup>[96]</sup> bezeichnen den Zusammenhang zwischen Teilcheneigenschaften und ROS-Bildung als „the most controversial issue and greatest challenge to nano(eco)toxicology“. Dies beruht auf der Vorstellung, dass eine Korrelation zwischen Eigenschaften und Effekten keinen Kausalzusammenhang zwischen beiden impliziert. Ein gutes Beispiel dafür ist die Studie von Angel et al.,<sup>[137]</sup> die den Mechanismus der toxischen Wirkung von  $\text{CeO}_2$  auf Mikroalgen untersuchten. Sie fanden, dass nm-großes  $\text{CeO}_2$  toxi-



**Abbildung 8.** Transfer von ZnO-ENPs auf Zebrafische, die mit prä-exponierter *D. magna* gefüttert wurden. 14 Tage Aufnahme (◆) und 7 Tage Ausscheidung (◆). *D. magna* wurde 1 mg Zn<sup>2+</sup> ausgesetzt, mit a) ZnO-ENPs oder b) ZnO-Octyl-ENPs über 24 h vor der Fütterung an die Zebrafische. Eine Anpassung mit einem Modell erster Ordnung ist durch die durchgezogene Linie angedeutet. Einschub: TEM-Bild der ZnO-ENPs in hochreinem Wasser mit Anzahl-Durchmesser-Histogramm und einer Durchschnittsgröße von (30 ± 17) nm (*n* = 894). Modifiziert aus Lit. [128].

scher als  $\mu\text{m}$ -großes war, und beobachteten einen Zusammenhang zwischen der ROS-Bildung und der Toxizität unter normalen Lichtverhältnissen. Allerdings verringerte UV-gefiltertes Licht die ROS-Bildung, nicht aber die Toxizität, was darauf schließen ließ, dass die ROS-Bildung nicht die bestimmende toxische Wirkung war. Auch konnte der Effekt von gelöstem Cer wegen der nur geringfügigen Auflösung während des Tests ignoriert werden. Stattdessen erwies sich die Sorption der ENPs an die Algen als die wahrscheinlichste Ursache der Toxizität. Es gibt viele Wege, die ROS, oxidativen Stress und zelluläre Toxizität miteinander verknüpfen, was die Ermittlung eines Kausalzusammenhangs sowie die Identifizierung von ENP-Eigenschaften, die diese Effekte bestimmen, erschwert. Die Bildung von extra- oder intrazellulären ROS kann eine Kaskade zellulärer Ereignisse auslösen, einschließlich oxidativem Stress und Membranschäden, was schlussendlich zu DNA-Schäden und Zytotoxizität führen kann.<sup>[96,133]</sup> Das Gegenteil wird ebenfalls vorgeschlagen, nämlich dass ENPs zelluläre Toxizität durch andere Mechanismen induzieren können, z. B. DNA-Läsionen, Störung der zellulären Homöostase und Membranschäden, was

zu zellulärem Stress und der Akkumulation von intrazellulären ROS führt.<sup>[138]</sup>

Zahlreiche Teilcheneigenschaften könnten für die ROS-Bildung relevant sein. Beispielsweise postulierten Fu et al.<sup>[133]</sup> dass zu den ENP-Eigenschaften, die eine ROS-Bildung beeinflussen können, die folgenden zählen: Größe, Form und Oberfläche der Partikel, positive Oberflächenladungen, funktionelle Oberflächengruppen, Partikelauflösung, Freisetzung von Metallionen aus nanoskaligen Metall- und Metalloxydpartikeln, Aktivierung durch UV-Licht, Aggregation, Wechselwirkung mit Zellen, Entzündungsreaktionen und pH-Wert des Mediums. Von Moos und Slaveykova<sup>[96]</sup> betonten dagegen die Wichtigkeit der chemischen Zusammensetzung und Reinheit, der Partikelgröße und -form, der resultierenden großen reaktiven Oberfläche sowie der Oberflächenchemie. Eigenschaften, die theoretisch mit der ROS-Bildung und dem oxidativen Stress verknüpft sein könnten, sind die katalytische Aktivität oder Redoxaktivität der ENPs, die es beispielsweise Cu- und Pt-ENPs ermöglichen, an Elektronentransfer/-teilungs/-bindungs-Prozessen mit den umgebenden Molekülen teilzunehmen. Tatsächlich wurde gefunden, dass CuO- und Pt-ENPs hohe Niveaus an oxidativem Stress bei Mikroalgen bewirken.<sup>[26,139]</sup> Bei Pt-ENPs wurde dieser Effekt nicht dem aufgelösten Pt zugeschrieben, und bei CuO-ENPs und CuCl<sub>2</sub> unterschieden sich die Kinetiken für den oxidativen Stress, was auch auf eine Nanopartikel-spezifische toxische Wirkungsweise und/oder eine Erhöhung der Bioverfügbarkeit von Ionen, die durch die Gegenwart von ENPs verursacht wird, schließen lässt.

Ma et al.<sup>[84]</sup> untersuchten die Ökotoxizität von ZnO-ENPs und schlossen: „There is not sufficient amount of studies toward a specific physico-chemical parameter (e.g., particle size) or a specific test species that allows for statistical analysis of correlation between physico-chemical properties and ecotoxicity“. Im Weiteren unterstrichen Ma et al.<sup>[84]</sup> jedoch sowohl die Löslichkeit als auch die Photoreaktivität als Schlüsseleigenschaften für die ZnO-Ökotoxizität. Auf Basis von Bandenergieberechnungen zur Abschätzung des Potentials für die Störung des zellulären Redoxgleichgewichts wurde vorgeschlagen, dass Oxid-ENPs generell auf vorher-sagbare Weise oxidativen Stress auslösen.<sup>[140]</sup> Bandenergien und der ionische Index des Metallkations erwiesen sich als geeignete Deskriptoren in einer Studie der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SARs) von 24 Metalloxyd-ENPs,<sup>[141]</sup> was das Postulat vom oxidativen Stress bekräftigte. Allerdings ist dieser Ansatz vereinfachend und berücksichtigt nicht vollständig die Metalloxydtoxizität aller ENPs, beispielsweise unterhalb einer bestimmten Größe.<sup>[96,142,143]</sup> Im Allgemeinen befinden sich ENP-bezogene SARs (besonders quantitative SARs) immer noch in einem frühen Entwicklungsstadium, und es wird noch lange dauern, bis sie zu einem zuverlässigen Hilfsmittel für die Regulatorik werden.<sup>[144]</sup>

## 6. Auswirkungen des ENP-Verhaltens bei Richtlinientests zur Bewertung der Chemikaliensicherheit

Für herkömmliche Chemikalien gibt es eine Reihe von OECD-Testrichtlinien, die für den regulatorischen Einsatz

und für Qualitätsmessungen der Relevanz und Zuverlässigkeit empfohlen werden, um die Adäquatheit der Testergebnisse für die regulatorische Entscheidungsfindung zu gewährleisten. Die Testrichtlinien beruhen auf der Annahme, dass für einen gegebenen Organismus die Toxizität einer Chemikalie nur von der Chemikalienkonzentration abhängt, weil alle anderen möglichen Einflussfaktoren (z. B. Testlänge, Medienzusammensetzung, pH und Temperatur) definiert worden sind. Für derartige Überprüfungen sind auch geeignete Testorganismen aus dem Basissatz von Tests der aquatischen Ökotoxizität spezifiziert worden, was den Vergleich von Werten aus Konzentrations-Wirkungs-Experimenten ermöglicht. Damit ein Testresultat gültig ist, muss eine Reihe von Gültigkeitskriterien erfüllt werden, darunter eine konstante und wohldefinierte Expositionskonzentration. Werden diese Testrichtlinien auf ENPs angewendet, zeigt dieser Aufsatz, dass eine Reihe technischer Hindernisse im Zusammenhang mit der Natur und dem Verhalten der ENPs das Aufdecken von Nanopartikeleffekten bei den derzeit genutzten Tests der aquatischen Toxizität verhindern könnte. Viele dieser Hindernisse stehen im Zusammenhang mit Schwierigkeiten, stabile Expositionsbedingungen während der Inkubationszeit in den Toxizitätstests aufrechtzuerhalten.<sup>[41]</sup> Diese Herausforderungen sind nicht für ENPs spezifisch. Beispielsweise sind Auflösungsprobleme dafür bekannt, Tests von hoch lipophilen oder schwerlöslichen Chemikalien zu beeinflussen. Dennoch sind Tests der aquatischen Ökotoxizität von ENPs wegen der graduellen Umwandlungen des ENP-Zustandes im Laufe der Inkubation komplexer (wie in Abbildung 2 illustriert). Andererseits kann man für Phänomene, die auch bei herkömmlichen Substanzen auftreten, Parallelen zu ENPs ziehen. Dies ist besonders relevant für die so genannten „schwierigen Substanzen“, für die spezifische Anleitungen für Ökotoxizitätstests erhältlich sind.<sup>[58]</sup> Selbst wenn man davon ausgeht, dass eine stabile ENP-Suspension einer Chemikalie in Lösung entspricht, gibt es doch grundlegende Unterschiede zwischen dem Verhalten von ENPs und sich lösenden Chemikalien in aquatischen Medien sowie bei ihren Wechselwirkungen mit biologischen Systemen. Für (teilweise) lösliche ENPs werden Erfahrungen bei konventionellen Chemikalien (zumeist Metallen und Metallsalzen) dazu beitragen, eine mögliche Überschusstoxizität in diesen Tests aufzudecken. Allerdings bringt für alle ENPs (löslich oder nicht) die Gegenwart von Partikeln in Suspension eine Reihe von Schwierigkeiten bei der Interpretation und Quantifizierung der beobachteten Effekte mit sich.<sup>[30]</sup> Insofern spielt das Aggregations- und Agglomerationsverhalten von ENPs in aquatischen Medien eine bedeutende Rolle und stellt Wissenschaftler vor eine große Hürde.<sup>[30,145,146]</sup> Selbst für die gleichen ENPs, beispielsweise ZnO, liefern Unterschiede in der Vorbereitung von Stammsuspensionen (inklusive des genauen Timings), ebenso wie in der Zusammensetzung des Testmediums, bei den Richtlinientests Resultate, die sich um Größenordnungen unterscheiden.<sup>[145,146]</sup> Diese Hindernisse müssen überwunden werden, wenn man zuverlässige und vergleichbare Testresultate erzielen möchte,<sup>[147]</sup> doch dies ist schwierig wegen einer Reihe von Faktoren, die die Stabilität der Testsuspensionen beeinflussen. Instabile Suspensionen führen zu gemischten Expositionsbedingungen, bei denen die

effektive Dosis nicht gut definiert ist. Dies erschwert die Bewertung der Testresultate in Bezug auf die Korrelation zwischen Dosis und Wirkung; sprich: Wenn die Dosis nicht definiert ist, ist die Quantifizierung der Effekte, die für die Risikobewertung benötigt wird, natürlich ungültig. Die Dynamik der auftretenden Prozesse verkompliziert diese Situation weiter, da instabile Suspensionen während der Inkubation eine Reihe von Transformationsprozessen eingehen, wenn keine Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden.<sup>[44,74,145,148]</sup> Der Grund hierfür sind die dynamischen – und oft unvorhersehbaren – Wechselwirkungen mit den Testmedien-Komponenten (z. B. gibt es in den meisten standardisierten Testmedien zahlreiche zweiwertige Kationen wie  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ), mit den Testbedingungen (z. B. Inkubationszeit, pH, Licht und Temperatur) sowie mit den Testorganismen (z. B. Aufnahme und biologische Modifizierung von Nanopartikeln in *D. magna*; Algenexsudate, die das Agglomerationsverhalten von Nanopartikeln während der Inkubation modifizieren). Angesichts dieser Faktoren, die die Testresultate beeinflussen können, sowie der Tatsache, dass enge Korrelationen zwischen den inhärenten Eigenschaften der ENPs und den Testbedingungen noch gefunden werden müssen, kann man derzeit nur schwer behaupten, dass eine wohldefinierte Dosierung einstellbar ist, wenn ENPs gemäß den Testrichtlinien geprüft werden.

Da es schwierig ist, die Exposition im Laufe der Inkubation streng zu kontrollieren, besteht eine andere Herangehensweise darin, die Exposition durch zeitabhängige Messungen zu beschreiben und zu quantifizieren. Das Messen der Wasserphasenkonzentration wird zweifellos nützliche Informationen über die Stabilität von ENPs in Suspension liefern. Wie in diesem Aufsatz beschrieben, könnte es jedoch notwendig sein, die tatsächlichen Expositionskonzentrationen infolge dynamischer Phänomene wie Partikeladhäsion an Organismen, Sedimentation, Auflösung und aktiver Aufnahme von ENPs zu definieren. Letztlich könnte die Verdünnung von Stammsuspensionen und Testkonzentrationen die beiden Prozesse beeinflussen, die wahrscheinlich bestimmend für Toxizität von ENPs sind: das Auflösungs- und das Agglomerationsverhalten.<sup>[44,49,54]</sup> Werden diese Einflussfaktoren nicht beachtet, könnten Testartefakte die Resultate von Standardtoxizitätstests so sehr verfälschen, dass die Resultate unzuverlässig und sogar irrelevant sind.<sup>[149]</sup> Wie von Handy et al. festgestellt,<sup>[150]</sup> könnten Kontrollmessungen und Best-Practice-Vorgehensweisen dabei helfen, solche Probleme bei den definierten Tests zu überwinden, allerdings gibt es hierfür noch immer keine spezifischen technischen Empfehlungen.

Um einigen dieser Bedenken zu begegnen, wurde 2009 von der OECD WPMN das „Guidance Manual for the Testing of Manufactured Nanomaterials“ entwickelt, um zu gewährleisten, dass die beim ENP-Testprogramm der OECD gesammelten Informationen zuverlässige, genaue und konsistente Ergebnisse liefern.<sup>[151]</sup> Dem folgte eine Anleitung für die Probenvorbereitung und Dosimetrie als Hilfestellung für das Erzielen sinnvoller und reproduzierbarer Resultate bei Tests gemäß den OECD-Richtlinien.<sup>[152]</sup> Dieser Leitfaden enthält fünfzehn Punkte, die für Ökotoxizitätsstudien unter Einhaltung der aktuellen OECD-Richtlinien dokumentiert werden müssen. Unter diesen sind: die Methode der Sus-



pension (verschiedene Suspensionsmethoden könnten den ENP-Zustand oder die ENP-Toxizität deutlich ändern); die Quantifizierung der Qualität der Medien in sowohl Stammsuspensionen als auch Testmedien; physikalische und chemische Charakterisierung der ENPs im Prüfmedium als ein Minimum (idealerweise sollte die Charakterisierung an verschiedenen Punkten während des Tests ausgeführt werden) vor und nach der Inkubation (z.B. Partikelgröße und/oder Agglomeratgrößenverteilung und ENP-Konzentration).<sup>[153]</sup> Diese Ergänzung zu den vorhandenen Tests gemäß den OECD-Richtlinien adressiert die Tatsache, dass – weil es schwierig ist, die Exposition gegenüber ENPs während der Inkubation vollständig zu kontrollieren – Einblicke in die Reproduzierbarkeit, Zuverlässigkeit und Relevanz der Testresultate durch eine detaillierte Beschreibung der Exposition erhältlich sind.<sup>[23]</sup> Abschließend ist zu festzuhalten, dass die verwendete Dosis-Maßeinheit ein Problem bei der Nutzung von Ökotoxizitäts-Testresultaten für die Risikobewertung ist. Um relevante und zuverlässige Ergebnisse für Dosis-Wirkungs-Bewertungen zu erhalten, müssen die ökotoxikologischen Untersuchungen in der geeigneten Dosis-Maßeinheit für die studierten ENPs wiedergegeben werden. Als geeignete Maßeinheiten sind die Partikelzahl oder die spezifische Oberfläche empfohlen worden;<sup>[24,55,154,155]</sup> allerdings ist die Anzahl der Studien, in denen diese Maßeinheiten angewendet worden sind, immer noch zu klein, um sicher sein zu können, dass diese neuen Maßeinheiten besser geeignet sind, um die effektiven Konzentrationen auszudrücken, als die traditionellen, massenbasierten Konzentrationen.

## 7. Abschließende Bemerkungen

Dieser Aufsatz bietet einen Ansatz zur Verbesserung von Nanoökotoxizitätstests, indem er drei verschiedene Arten von Störungen definiert, die Nanopartikel-spezifische Effekte überdecken können. Deren fehlende Berücksichtigung verhindert eine zuverlässige Beurteilung, ob ENPs in der Tat neuartige und bisher unbekannte Gefahren für die Umwelt mit sich bringen. Wir schlagen vor, dass alle ökotoxikologischen Untersuchungen von ENPs klären sollten, ob sich ENPs physikalisch an Organismen haften, ob sie sich in wässrigen Medien auflösen und ob sie internalisiert/diskret im/am Testorganismus lokalisiert sein könnten. Darüber hinaus empfehlen wir, dass bekannte Wirkungsmechanismen von ENPs, z.B. die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), in Ökotoxizitätstests berücksichtigt werden sollten. Für jeden der drei Reaktionstypen können auf Grundlage dieses Aufsatzes mehrere Schlussfolgerungen gezogen werden:

1) Die Auflösung von löslichen ENPs kann einen großen Teil der beobachteten Effekte in Fischen, Krustentieren und Algen beschreiben. Es wurden jedoch in einigen Studien Effekte beobachtet, die nicht nur von der gelösten Fraktion herrührten. Um den Beitrag der gelösten Fraktion zur aquatischen Toxizität von ENPs aufzuklären, ist es unverzichtbar, das ENP-Auflösungsverhalten in Testmedien während des Tests zu charakterisieren.

- 2) Subletale Wirkungen aufgrund einer physikalischen Bindung von ENPs an Organismen wurden für sowohl hohe ( $> 10 \text{ mg L}^{-1}$ ) als auch niedrige Konzentrationen ( $< 1 \text{ mg L}^{-1}$ ) dokumentiert. Während Reaktionen infolge physikalischer Bindung von ENPs an Organismen für alle drei Gruppen von Organismen dokumentiert worden sind, wurden die subletalen Effekte bei niedrigeren Konzentrationen am häufigsten für Krustentiere beobachtet. In diesen Fällen können die Effekte mit Energiedefiziten, wie reduzierten Häutungsraten, Änderungen im Fressverhalten und der Ausscheidung von nicht nahrhaften Teilchen im aufnehmbaren Partikelgrößenbereich von Krustentieren, in Beziehung gesetzt werden. Daher müssen physikalische Effekte entweder berücksichtigt oder so gut wie möglich eliminiert werden, auch bei geringeren Konzentrationen ( $< 1 \text{ mg L}^{-1}$ ), um zu vermeiden, dass Nanopartikeleffekte überdeckt werden.
- 3) Es wurde gefunden, dass ENPs durch Mechanismen in aquatischen Testorganismen internalisiert und akkumuliert werden, die sich von denen unterscheiden, die herkömmlicherweise bei gelösten Chemikalien beobachtet werden. Weiterhin zeigte sich, dass die Transformation und Reaktivität von ENPs nach der Internalisierung (z.B. Freisetzung von Metallionen oder ROS-Bildung) andere Auswirkungen als die gelösten Chemikalien hat, und zwar aufgrund des Anhaftens an das Gewebe und/oder Translokation in den Organismen. Allerdings sind die wichtigsten Parameter für die Internalisierung von ENPs und die jeweiligen toxischen Mechanismen *in vivo* bei aquatischen Organismen nicht gut verstanden. Das Fehlen zuverlässiger Techniken, um ENPs in lebenden Organismen und Gewebeprobe zu quantifizieren und zu charakterisieren, ist hier ein limitierender Faktor.

Durch die Überprüfung der aktuellen Literatur zur Ökotoxizität von ENPs wurde festgestellt, dass einige der am häufigsten verwendeten ENPs anhand ihres Verhaltens bei Wassertoxizitätstests gruppiert werden können:

- Agglomeration ist von großer Bedeutung für alle ENPs, jedoch vor allem für  $\text{TiO}_2$  und  $\text{CeO}_2$ .<sup>[54,60,145,154]</sup> Es ist in der Praxis schwierig, eine stabile Suspension für diese Partikel in den Medien beizubehalten. Eine Sedimentation von  $\text{TiO}_2$ - und  $\text{CeO}_2$ -ENPs wird oft beobachtet, und physikalische Auswirkungen auf Testorganismen sind wahrscheinlich.
- Für Ag-, ZnO- und CuO-ENPs konnte die beobachtete Toxizität häufig durch Auflösung im Testmedium und Freisetzung ionischer Metallspezies erklärt werden.<sup>[156]</sup> Die gelösten Metallionen werden in den meisten Fällen toxischer sein als die entsprechenden ENPs, jedoch wurden einige Ausnahmen gefunden, die auf einen Nanopartikeleffekt hinweisen. Es ist jedoch anspruchsvoll, die Auflösung unter realen Testbedingungen zu quantifizieren, und ohne hohe analytische Rückgewinnungsraten und vollständige Massenbilanzen sollten Aussagen über einen Nanopartikeleffekt infolge einer „höheren Toxizität als derjenigen, die sich durch das gelöste Metall erklären lässt,“ sorgfältig geprüft werden. Darüber hinaus ist zu betonen, dass der Auflösungsprozess dynamisch ist und

sich von der Herstellung von Stammsuspensionen vor dem Testen bis hin zur eigentlichen Testphase fortsetzt.<sup>[74]</sup>

Für die genannten ENPs sind die Möglichkeiten, Nanopartikeleffekte aufzudecken, also direkt mit einer adäquaten Quantifizierung ihrer Agglomeration und Auflösung verknüpft. In der Praxis tritt wahrscheinlich simultan eine Kombination aus den Störfaktoren auf, und auch wenn diese Faktoren berücksichtigt werden, bleibt die Identifizierung weiterer Nanopartikeleffekte kompliziert.

Die Interpretation biologischer Reaktionen auf ENPs ist bei aktuellen Richtlinientests zur Risikobewertung kompliziert, da es schwierig ist, während des Testens konstante Expositionsbedingungen beizubehalten. Eine Reihe technischer Hindernisse ergibt sich aus den inhärenten Unterschieden zwischen ENPs und aufgelösten Chemikalien, für welche die Tests ursprünglich entwickelt wurden. Das Verhalten von ENPs unter den Testbedingungen ist sehr schwierig zu steuern, und die Zuverlässigkeit der Testresultate erfordert eine umfangreiche Charakterisierung der ENPs sowie die detaillierte Beschreibung der beobachteten biologischen Reaktionen in den Testsystemen. Wir halten dies für den künftigen Weg, um Daten zu erhalten, die sich einerseits für regulatorische Zwecke eignen und andererseits Nanopartikeleffekte aufdecken können.

## Danksagung

Diese Arbeit wurde freundlicherweise von EnvNano (ERC Grants-Nr. 281579) NanoRem (RP7 Finanzhilfe -Nr. 309517) und dem VCI e.V. unterstützt.

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 15224–15239  
*Angew. Chem.* **2016**, 128, 15448–15464

- [1] Woodrow Wilson International Center for Scholars, „The Project of Emerging Nanotechnologies“; <http://www.nanotechproject.org/inventories/>, **2016**.
- [2] Danish Environmental Protection Agency, „The Nanodatabase“; <http://nanodb.dk/>.
- [3] S. F. Hansen, L. R. Heggelund, P. R. Besora, A. Mackevica, A. Boldrin, A. Baun, *Environ. Sci. Nano* **2016**, 3, 169–180.
- [4] F. Piccinno, F. Gottschalk, S. Seeger, B. Nowack, *J. Nanopart. Res.* **2012**, 14, DOI: 10.1007/s11051-012-1109-9.
- [5] R. Kaegi et al., *Environ. Pollut.* **2008**, 156, 233–239.
- [6] L. Geranio, M. Heuberger, B. Nowack, *Environ. Sci. Technol.* **2009**, 43, 8113–8118.
- [7] K. D. Grieger, A. Fjordboge, N. B. Hartmann, E. Eriksson, P. L. Bjerg, A. Baun, *J. Contam. Hydrol.* **2010**, 118, 165–183.
- [8] A. Mackevica, M. E. Olsson, S. F. Hansen, *J. Nanopart. Res.* **2016**, 18, DOI: 10.1007/s11051-015-3313-x.
- [9] E. Oberdörster, *Environ. Health Perspect.* **2004**, 112, 1058–1062.
- [10] T. B. Henry, F.-M. Menn, J. T. Fleming, J. Wilgus, R. N. Compton, G. S. Sayler, *Environ. Health Perspect.* **2007**, 115, 1059–1065.
- [11] A. Baun, N. B. Hartmann, K. Grieger, K. O. Kusk, *Ecotoxicology* **2008**, 17, 387–395.
- [12] E. Navarro, A. Baun, R. Behra, N. B. Hartmann, J. Filser, A.-J. Miao, A. Quigg, P. H. Santschi, L. Sigg, *Ecotoxicology* **2008**, 17, 372–386.
- [13] R. D. Handy, F. von der Kammer, J. R. Lead, M. Hasselov, R. Owen, M. Crane, *Ecotoxicology* **2008**, 17, 287–314.
- [14] K. Juganson, A. Ivask, I. Blinova, M. Mortimer, A. Kahru, Beilstein *J. Nanotechnol.* **2015**, 6, 1788–1804.
- [15] M. R. Wiesner, J.-Y. Bottero, C. R. Phys. **2011**, 12, 659–668.
- [16] A. Franco, S. F. Hansen, S. I. Olsen, L. Butti, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2007**, 48, 171–183.
- [17] OECD, „Nanosafety at the OECD: The first six years“; <http://www.oecd.org/science/nanosafety/>, **2016**.
- [18] S. F. Hansen, D. Gee, *J. Epidemiol. Community Heal.* **2014**, DOI: 10.1136/jech-2014-204019.
- [19] S. Wagner, A. Gondikas, E. Neubauer, T. Hofmann, F. von der Kammer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 12398–12419; *Angew. Chem.* **2014**, 126, 12604–12626.
- [20] W. J. G. M. Peijnenburg et al., *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **2015**, 45, 2084–2134.
- [21] S. F. Hansen, B. H. Larsen, S. I. Olsen, A. Baun, *Nanotoxicology* **2007**, 1, 243–250.
- [22] V. Stone et al., *Engineered Nanoparticles: Review of Health and Environmental Safety (ENRHES)*, Europäische Kommission, **2010**.
- [23] H. Lützhøft, N. Hartmann, A. Brinch, J. Kjølholt, A. Baun, *Environmental Effects of Engineered Nanomaterials: Estimations of Predicted No-Effect Concentrations (PNECs)*, Kopenhagen, Dänemark, **2015**.
- [24] J. T. K. Quik, J. A. Vonk, S. F. Hansen, A. Baun, D. Van De Meent, *Environ. Int.* **2011**, 37, 1068–1077.
- [25] A. Praetorius, N. Tufenkji, K.-U. Goss, M. Scheringer, F. von der Kammer, M. Elimelech, *Environ. Sci. Nano* **2014**, 1, 317–323.
- [26] S. N. Sørensen, C. Engelbrekt, H.-C. H. Lützhøft, J. Jiménez-Lamana, J. S. Noori, F. A. Alatraktchi, C. G. Delgado, V. I. Slaveykova, A. Baun, *Environ. Sci. Technol.* **2016**, 50, 10635–10643.
- [27] V. Žutić, V. Svetličić in *Handb. Environ. Chem.*, Springer, Heidelberg, **2000**, S. 149–165.
- [28] S. S. Zumdahl, *Chemical Principles*, Houghton Mifflin Company, Boston, **1998**.
- [29] P. W. Atkins, *Physical Chemistry*, Oxford University Press, Oxford, **1990**.
- [30] N. B. Hartmann, K. A. Jensen, A. Baun, K. Rasmussen, H. Rauscher, R. Tantra, D. Cupi, D. Gilliland, F. Pianella, J. M. R. Sintes, *J. Toxicol. Environ. Health Part B* **2015**, 18, 299–326.
- [31] F. von der Kammer, S. Ottofuelling, T. Hofmann, *Environ. Pollut.* **2010**, 158, 3472–3481.
- [32] L. Gao, Q. Zhang, *Scr. Mater.* **2001**, 44, 1195–1198.
- [33] P. A. Holden et al., *Environ. Sci. Technol.* **2016**, 50, 6124–6145.
- [34] M. Baalousha, G. Cornelis, T. A. J. Kuhlbusch, I. Lynch, C. Nickel, W. Peijnenburg, N. W. van den Brink, *Environ. Sci. Nano* **2016**, 3, 323–345.
- [35] Z. Wang, L. Zhang, J. Zhao, B. Xing, *Environ. Sci. Nano* **2016**, 3, 240–255.
- [36] H. Ma, P. L. Williams, S. A. Diamond, *Environ. Pollut.* **2013**, 172, 76–85.
- [37] J. I. Kwak, Y.-J. An, *Int. J. Environ. Sci. Technol.* **2015**, 12, 1163–1172.
- [38] B. Collin et al., *Environ. Sci. Nano* **2014**, 1, 533–548.
- [39] D.-H. Nam, B.-C. Lee, I.-C. Eom, P. Kim, M.-K. Yeo, *Mol. Cell. Toxicol.* **2014**, 10, 9–17.
- [40] R. D. Handy et al., *Ecotoxicology* **2012**, 21, 933–972.
- [41] E. J. Petersen et al., *Environ. Sci. Technol.* **2015**, 49, 9532–9547.
- [42] A. Baun, S. N. Sørensen, R. F. Rasmussen, N. B. Hartmann, C. B. Koch, *Aquat. Toxicol.* **2008**, 86, 379–387.
- [43] S. N. Sørensen, R. Hjorth, C. G. Delgado, N. B. Hartmann, A. Baun, *Integr. Environ. Assess. Manage.* **2015**, 11, 722–724.

- [44] M. Baalousha, M. Sikder, A. Prasad, J. Lead, R. Merrifield, G. T. Chandler, *Environ. Chem.* **2016**, *13*, 1–3.
- [45] F. Schwab, T. D. Bucheli, L. P. Lukhele, A. Magrez, B. Nowack, L. Sigg, K. Knauer, *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45*, 6136–6144.
- [46] E. Artells, J. Issartel, M. Auffan, D. Borschneck, A. Thill, M. Tella, L. Brousset, J. Rose, J.-Y. Bottero, A. Thiéry, *PLoS One* **2013**, *8*, e71260.
- [47] A. Dabrunz, L. Duester, C. Prasse, F. Seitz, R. Rosenfeldt, C. Schilde, G. E. Schaumann, R. Schulz, *PLoS One* **2011**, *6*, e20112.
- [48] C. J. Smith, B. J. Shaw, R. D. Handy, *Aquat. Toxicol.* **2007**, *82*, 94–109.
- [49] M. Baalousha, J. R. Lead, F. von der Kammer, T. Hofmann in *Environ. Hum. Heal. Impacts Nanotechnol.* (Hrsg.: J. R. Lead, E. Smith), Wiley, Chichester, **2009**.
- [50] A. Oukarroum, S. Bras, F. Perreault, R. Popovic, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2012**, *78*, 80–85.
- [51] B. Marsalek, D. Jancula, E. Marsalkova, M. Mashlan, K. Safarova, J. Tucek, R. Zboril, *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46*, 2316–2323.
- [52] W. Jiang, H. Mashayekhi, B. Xing, *Environ. Pollut.* **2009**, *157*, 1619–1625.
- [53] I. M. Sadiq, S. Dalai, N. Chandrasekaran, A. Mukherjee, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2011**, *74*, 1180–1187.
- [54] N. B. Hartmann, F. Von der Kammer, T. Hofmann, M. Baalousha, S. Ottofuelling, A. Baun, *Toxicology* **2010**, *269*, 190–197.
- [55] K. Van Hoecke, K. A. C. De Schampelaere, P. der Meeren, G. Smaghe, C. R. Janssen, *Environ. Pollut.* **2011**, *159*, 970–976.
- [56] V. Aruoja, H.-C. Dubourguier, K. Kasemets, A. Kahru, *Sci. Total Environ.* **2009**, *407*, 1461–1468.
- [57] R. Hjorth, S. N. Sorensen, M. E. Olsson, A. Baun, N. B. Hartmann, *Integr. Environ. Assess. Manage.* **2016**, *12*, 200–202.
- [58] OECD, Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, **2000**.
- [59] N. B. Hartmann, C. Engelbrekt, J. Zhang, J. Ulstrup, K. O. Kusk, A. Baun, *Nanotoxicology* **2013**, *7*, 1082–1094.
- [60] B. K. Gaiser et al., *Environ. Toxicol. Chem.* **2012**, *31*, 144–154.
- [61] J. W. McMahon, F. H. Rigler, *Limnol. Oceanogr.* **1965**, *10*, 105–113.
- [62] S. Rehse, W. Kloas, C. Zarfl, *Chemosphere* **2016**, *153*, 91–99.
- [63] S. B. Lovern, J. R. Strickler, R. Klaper, *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41*, 4465–4470.
- [64] R. Pirow, F. Wollinger, R. J. Paul, *J. Exp. Biol.* **1999**, *202*, 3089–3099.
- [65] M. D. Seidl, R. Pirow, R. J. Paul, *Zoology* **2002**, *105*, 15–23.
- [66] S. Asghari, S. A. Johari, J. H. Lee, Y. S. Kim, Y. B. Jeon, H. J. Choi, M. C. Moon, I. J. Yu, *J. Nanobiotechnol.* **2012**, *10*, 1–11.
- [67] G. Laban, L. F. Nies, R. F. Turco, J. W. Bickham, M. S. Sepúlveda, *Ecotoxicology* **2010**, *19*, 185–195.
- [68] B. D. Johnston, T. M. Scown, J. Moger, S. A. Cumberland, M. Baalousha, K. Linge, R. van Aerle, K. Jarvis, J. R. Lead, C. R. Tyler, *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 1144–1151.
- [69] G. Federici, B. J. Shaw, R. D. Handy, *Aquat. Toxicol.* **2007**, *84*, 415–430.
- [70] R. J. Griffith, N. J. Brown-Peterson, D. A. Savin, C. S. Manning, I. Boubé, R. A. Ryan, M. Brouwer, *Environ. Toxicol. Chem.* **2012**, *31*, 160–167.
- [71] Q. Chen, D. Yin, J. Li, X. Hu, *Environ. Toxicol. Chem.* **2014**, *33*, 1090–1097.
- [72] S. Ma, D. Lin, *Environ. Sci. Processes Impacts* **2013**, *15*, 145–160.
- [73] S. K. Misra, A. Dybowska, D. Berhanu, S. N. Luoma, E. Valsami-Jones, *Sci. Total Environ.* **2012**, *438*, 225–232.
- [74] S. N. Sørensen, A. Baun, *Nanotoxicology* **2015**, *9*, 201–209.
- [75] S. N. Sørensen, Aquatic Toxicity Testing for Hazard Identification of Engineered Nanoparticles, Ph.D. Thesis, Technical University of Denmark, **2016**.
- [76] S.-W. Bian, I. A. Mudunkotuwa, T. Rupasinghe, V. H. Grassian, *Langmuir* **2011**, *27*, 6059–6068.
- [77] R. D. Kent, P. J. Vikesland, *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46*, 6977–6984.
- [78] A. P. Gondikas, A. Morris, B. C. Reinsch, S. M. Marinakos, G. V. Lowry, H. Hsu-Kim, *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46*, 7037–7045.
- [79] S. K. Misra, A. Dybowska, D. Berhanu, M. N. Croteau, S. N. Luoma, A. R. Boccaccini, E. Valsami-Jones, *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46*, 1216–1222.
- [80] Y.-W. Baek, Y.-J. An, *Sci. Total Environ.* **2011**, *409*, 1603–1608.
- [81] C. Zhang, Z. Hu, B. Deng, *Water Res.* **2016**, *88*, 403–427.
- [82] S. M. Hoheisel, S. Diamond, D. Mount, *Environ. Toxicol. Chem.* **2012**, *31*, 2557–2563.
- [83] H. J. Jo, J. W. Choi, S. H. Lee, S. W. Hong, *J. Hazard. Mater.* **2012**, *227*, 301–308.
- [84] H. Ma, P. L. Williams, S. A. Diamond, *Environ. Pollut.* **2013**, *172*, 76–85.
- [85] H. C. Poynton, J. M. Lazorchak, C. A. Impellitteri, B. J. Blalock, K. Rogers, H. J. Allen, A. Loguinov, J. L. Heckrnan, S. Govindaswamy, *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46*, 6288–6296.
- [86] R. J. Griffith, K. Hyndman, N. D. Denslow, D. S. Barber, *Toxicol. Sci.* **2009**, *107*, 404–415.
- [87] M. A. Anderson, F. M. M. Morel, R. R. L. Guillard, *Nature* **1978**, *276*, 70–71.
- [88] P. R. Paquin et al., *Comp. Biochem. Physiol. Part C* **2002**, *133*, 3–35.
- [89] S. N. Luoma, P. S. Rainbow, *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 1921–1931.
- [90] J. Buffle, K. J. Wilkinson, H. P. van Leeuwen, *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43*, 7170–7174.
- [91] W.-C. Hou, P. Westerhoff, J. D. Posner, *Environ. Sci. Impacts* **2013**, *15*, 103–122.
- [92] W. Geller, H. Muller, *Oecologia* **1981**, *49*, 316–321.
- [93] M. Gophen, W. Geller, *Oecologia* **1984**, *64*, 408–412.
- [94] L. M. Skjolding, Bioaccumulation and Trophic Transfer of Engineered Nanoparticles in Aquatic Organisms, Dissertation, Technical University of Denmark, **2015**.
- [95] C. M. Beddoes, C. P. Case, W. H. Briscoe, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2015**, *218*, 48–68.
- [96] N. von Moos, V. I. Slaveykova, *Nanotoxicology* **2014**, *8*, 605–630.
- [97] S. Leclerc, K. J. Wilkinson, *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, 358–364.
- [98] F. Schwab, G. Zhai, M. Kern, A. Turner, J. L. Schnoor, M. R. Wiesner, *Nanotoxicology* **2016**, *10*, 257–278.
- [99] F. Perreault, A. Oukarroum, S. P. Melegari, W. G. Matias, R. Popovic, *Chemosphere* **2012**, *87*, 1388–1394.
- [100] A.-J. Miao, Z. Luo, C.-S. Chen, W.-C. Chin, P. H. Santschi, A. Quigg, *PLoS One* **2010**, *5*, e15196–e15196.
- [101] P. L. Gillis, P. Chow-Fraser, J. F. Ranville, P. E. Ross, C. M. Wood, *Aquat. Toxicol.* **2005**, *71*, 143–154.
- [102] R. Handy, T. Henry, T. Scown, B. Johnston, C. Tyler, *Ecotoxicology* **2008**, *17*, 396–409.
- [103] K. Mattsson, M. T. Ekvall, L.-A. Hansson, S. Linse, A. Malmendal, T. Cedervall, *Environ. Sci. Technol.* **2015**, *49*, 553–561.
- [104] S. B. Lovern, H. A. Owen, R. Klaper, *Nanotoxicology* **2008**, *2*, 43–48.
- [105] M. Heinlaan, A. Kahru, K. Kasemets, B. Arbeille, G. Prensier, H.-C. Dubourguier, *Water Res.* **2011**, *45*, 179–190.
- [106] C.-M. Zhao, W.-X. Wang, *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46*, 11345–11351.
- [107] P. Rosenkranz, Q. Chaudhry, V. Stone, T. F. Fernandes, *Environ. Toxicol. Chem.* **2009**, *28*, 2142–2149.



- [108] A. Feswick, R. J. Griffitt, K. Siebein, D. S. Barber, *Aquat. Toxicol.* **2013**, *130*, 210–218.
- [109] L. D. Scanlan et al., *ACS Nano* **2013**, *7*, 10681–10694.
- [110] C. Brandenberger, M. J. D. Clift, D. Vanhecke, C. Muhlfeld, V. Stone, P. Gehr, B. Rothen-Rutishauser, *Part. Fibre Toxicol.* **2010**, *7*, 15.
- [111] A. J. Edgington, E. J. Petersen, A. A. Herzing, R. Podila, A. Rao, S. J. Klaine, *Nanotoxicology* **2014**, *8*, 2–10.
- [112] L. H. S. Jensen, L. M. Skjolding, A. Thit, C. Købler, K. Mølhave, A. Baun, *Environ. Toxicol. Chem.* **2016**, akzeptiert.
- [113] F. R. Khan, G. M. Kennaway, M.-N. Croteau, A. Dybowska, B. D. Smith, A. J. A. Nogueira, P. S. Rainbow, S. N. Luoma, E. Valsami-Jones, *Chemosphere* **2014**, *100*, 97–104.
- [114] L. M. Skjolding, K. Kern, R. Hjorth, N. Hartmann, S. Overgaard, G. Ma, J. G. C. Veinot, A. Baun, *Ecotoxicology* **2014**, *23*, 1172–1183.
- [115] D. Kwon, H. W. Nho, T. H. Yoon, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2015**, *15*, 4229–4238.
- [116] N. Santo, U. Fascio, F. Torres, N. Guazzoni, P. Tremolada, R. Bettinetti, P. Mantecca, R. Bacchetta, *Water Res.* **2014**, *53*, 339–350.
- [117] W.-M. Lee, Y.-J. An, *Nanotoxicology* **2015**, *9*, 407–412.
- [118] M. Asztemborska, M. Jakubiak, M. Ksiazek, R. Steborowski, H. Polkowska-Motrenko, G. Bystrzejewska-Piotrowska, *Nukleonika* **2014**, *59*, 169–173.
- [119] H. M. Maes, F. Stibany, S. Gieffers, B. Daniels, B. Deutschmann, W. Baumgartner, A. Schaeffer, *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, 12256–12264.
- [120] A. Dedeh, A. Ciutat, M. Treguer-Delapierre, J.-P. Bourdineaud, *Nanotoxicology* **2015**, *9*, 71–80.
- [121] M. Ates, Z. Arslan, V. Demir, J. Daniels, I. O. Farah, *Environ. Toxicol.* **2015**, *30*, 119–128.
- [122] O. J. Osborne, S. Lin, C. H. Chang, Z. Ji, X. Yu, X. Wang, S. Lin, T. Xia, A. E. Nel, *ACS Nano* **2015**, *9*, 9573–9584.
- [123] OECD, Ecotoxicity and Environmental Fate of Manufactured Nanomaterials: Test Guidelines, **2014**.
- [124] P. L. McNeil, D. Boyle, T. B. Henry, R. D. Handy, K. A. Sloman, *Aquat. Toxicol.* **2014**, *152*, 318–323.
- [125] B.-T. Lee, J. F. Ranville, *J. Hazard. Mater.* **2012**, *213*, 434–439.
- [126] E. J. Petersen, J. Akkanen, J. V. K. Kukkonen, W. J. Weber, Jr., *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43*, 2969–2975.
- [127] M.-H. Jang, W.-K. Kim, S.-K. Lee, T. B. Henry, J.-W. Park, *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, 11568–11574.
- [128] L. M. Skjolding, M. Winther-Nielsen, A. Baun, *Aquat. Toxicol.* **2014**, *157*, 101–108.
- [129] S. N. Sørensen, H.-C. H. Lützhøft, R. Rasmussen, A. Baun, *Aquat. Toxicol.* **2016**, *180*, 209–217.
- [130] A. Nel, T. Xia, L. Mädler, N. Li, *Science* **2006**, *311*, 622–627.
- [131] V. Stone, K. Donaldson, *Nat. Nanotechnol.* **2006**, *1*, 23–24.
- [132] S. J. Klaine, P. J. J. Alvarez, G. E. Batley, T. F. Fernandes, R. D. Handy, D. Y. Lyon, S. Mahendra, M. J. McLaughlin, J. R. Lead, *Environ. Toxicol. Chem.* **2008**, *27*, 1825–1851.
- [133] P. P. Fu, Q. Xia, H.-M. Hwang, P. C. Ray, H. Yu, *J. Food Drug Anal.* **2014**, *22*, 64–75.
- [134] G. Vale, K. Mehennaoui, S. Cambier, G. Libralato, S. Jomini, R. F. Domingos, *Aquat. Toxicol.* **2016**, *170*, 162–174.
- [135] A. Ivask, K. Juganson, O. Bondarenko, M. Mortimer, V. Aruoja, K. Kasemets, I. Blinova, M. Heinlaan, V. Slaveykova, A. Kahru, *Nanotoxicology* **2014**, *8*, 57–71.
- [136] A. D. Dwivedi, L. Q. Ma, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **2014**, *44*, 1679–1739.
- [137] B. M. Angel, P. Vallotton, S. C. Apte, *Aquat. Toxicol.* **2015**, *168*, 90–97.
- [138] C. Kaweeteerawat et al., *ACS Nano* **2015**, *9*, 7215–7225.
- [139] N. von Moos, L. Maillard, V. I. Slaveykova, *Aquat. Toxicol.* **2015**, *161*, 267–275.
- [140] E. Burello, A. P. Worth, *Nanotoxicology* **2011**, *5*, 228–235.
- [141] R. Liu, H. Y. Zhang, Z. X. Ji, R. Rallo, T. Xia, C. H. Chang, A. Nel, Y. Cohen, *Nanoscale* **2013**, *5*, 5644–5653.
- [142] H. Zhang et al., *ACS Nano* **2012**, *6*, 4349–4368.
- [143] A. B. Djurisić, Y. H. Leung, A. M. C. Ng, X. Y. Xu, P. K. H. Lee, N. Degger, R. S. S. Wu, *Small* **2015**, *11*, 26–44.
- [144] R. Tantra, C. Oksel, T. Puzyn, J. Wang, K. N. Robinson, X. Z. Wang, C. Y. Ma, T. Wilkins, *Nanotoxicology* **2015**, *9*, 636–642.
- [145] D. Cupi, N. B. Hartmann, A. Baun, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2016**, *127*, 144–152.
- [146] D. Cupi, N. B. Hartmann, A. Baun, *Environ. Toxicol. Chem.* **2015**, *34*, 497–506.
- [147] A. Baun, N. B. Hartmann, K. D. Grieger, S. F. Hansen, *J. Environ. Monit.* **2009**, *11*, 1774–1781.
- [148] M. Hassellöv, J. W. Readman, J. F. Ranville, K. Tiede, *Ecotoxicology* **2008**, *17*, 344–361.
- [149] E. J. Petersen, T. B. Henry, J. Zhao, R. I. MacCuspie, T. L. Kirschling, M. A. Dobrovolskaia, V. Hackley, B. Xing, J. C. White, *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, 4226–4246.
- [150] R. D. Handy et al., *Environ. Toxicol. Chem.* **2012**, *31*, 15–31.
- [151] OECD, Preliminary Review of OECD Test Guidelines for Their Applicability to Manufactured Nanomaterials, **2009**.
- [152] OECD, Guidance on Sample Preparation and Dosimetry for the Safety Testing of Manufactured Nanomaterials, **2012**.
- [153] A. Brinch, S. F. Hansen, N. B. Hartmann, A. Baun, *Nanomaterials* **2016**, *6*, 33.
- [154] K. Van Hoecke, K. A. C. De Schamphelaere, P. der Meeren, S. Lucas, C. R. Janssen, *Environ. Toxicol. Chem.* **2008**, *27*, 1948–1957.
- [155] R. Arvidsson, S. Molander, B. A. Sanden, M. Hasselöv, *Hum. Ecol. Risk Assess.* **2011**, *17*, 245–262.
- [156] D. A. Notter, D. M. Mitrano, B. Nowack, *Environ. Toxicol. Chem.* **2014**, *33*, 2733–2739.

Eingegangen am 20. Mai 2016

Online veröffentlicht am 9. November 2016